

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS NEUROPATIAS HEREDITÁRIAS: DOENÇA
DE CHARCOT-MARIE-TOOTH E NEUROPATIA HEREDITÁRIA COM
SUSCETIBILIDADE À PARALISIA POR PRESSÃO**

JANICE PACHECO DIAS PADILHA

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS NEUROPATIAS HEREDITÁRIAS: DOENÇA
DE CHARCOT-MARIE-TOOTH E NEUROPATIA HEREDITÁRIA COM
SUSCETIBILIDADE À PARALISIA POR PRESSÃO**

JANICE PACHECO DIAS PADILHA

Orientador: Prof. Dr. Jonas Alex Morales Saute

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências Médicas ênfase em Genética Médica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2019

Epígrafe:

“Toda a ciência começa como filosofia e termina em arte.”

Will Durant

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Jonas Alex Morales Saute, por todo ilustre conhecimento, paciência, empenho e empatia com que sempre me orientou neste trabalho e na minha formação teórico e prática durante todo o período do mestrado. Muito obrigada por ter me corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar. Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Laboratório de Genética Molecular, do Serviço de Genética Médica, especialmente a minha co-orientadora Ana Carolina Brusius Facchin, cuja orientação, apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. Por último, quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio incondicional que me deram, especialmente pela paciência nos últimos momentos e ao longo da elaboração deste trabalho. Não deixarei de mencionar também a uma pessoinha muito especial que me acompanhou no finalzinho desta trajetória.

RESUMO

Base teórica: As neuropatias hereditárias, em especial a doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT), são um grupo de doenças com grande heterogeneidade genética, havendo mais de 60 genes associados a estas condições. Diversos exames complementares, muitas vezes desnecessários e de alto custo, são realizados na tentativa de um diagnóstico definitivo e isto implica em um alto custo pessoal, familiar e social, mesmo sendo um grupo de doenças raras. O rendimento diagnóstico de estudos genéticos para a CMT é pouco conhecido, com falta de dados epidemiológicos para construir melhores estratégias fora dos EUA e da Europa.

Objetivo: O objetivo da presente dissertação foi avaliar o rendimento diagnóstico de estratégia sequencial de diagnóstico molecular para casos com suspeita de formas desmielinizantes de CMT (CMTde) ou Neuropatia Hereditária com Susceptibilidade à Paralisia por Pressão (HNPP) e de painel de genes por sequenciamento de nova geração (NGS) para casos com suspeita de formas axonais de CMT (CMTax). Além disso, visamos gerar dados epidemiológicos iniciais sobre os subtipos mais frequentes de CMT no sul do Brasil, bem como realizar caracterização clínica e neurofisiológica dos casos com diagnóstico confirmado.

Métodos: Foi realizado um estudo transversal em centro único, em que recrutamos consecutivamente famílias com suspeita clínica de CMT ou HNPP entre setembro de 2010 e agosto de 2019 no ambulatório de Genética Neuromuscular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Resultados: Foram avaliados 94 pacientes (55 famílias) com suspeita de CMT. O rendimento diagnóstico da estratégia combinada de *Multiplex-Ligation-dependent-Probe-Amplification* (MLPA) dos genes *PMP22/GJB1/MPZ* e de sequenciamento Sanger dos genes *PMP22*, *GJB1* e *MPZ* foi de 63,6% (28/44) para casos-índice com CMTde (21 CMT1A, 5 CMTX1 e 2 com provável diagnóstico de CMT1B). Cinco dos 11 casos-índice (45,4%) com suspeita de CMTax tiveram pelo menos um diagnóstico possível com painel de NGS de 104 genes relacionados a neuropatias hereditárias (1 CMT1A, 1 CMT2A, 1 CMT2K, 1 CMT2K, 1 CMT2U e 1 CMT2W). Todos os três casos-índice com suspeita de HNPP apresentaram deleção em heterozigose do *PMP22* no MLPA. Auxílio para marcha foi necessário para 15,4% dos pacientes com CMT, sendo que 5,5% estavam restritos a cadeira de rodas.

Conclusão: As estratégias sequenciais de diagnóstico molecular com MLPA e sequenciamento Sanger direcionado para CMTde apresentaram alto rendimento diagnóstico, e quase metade das famílias com CMTax tiveram pelo menos um diagnóstico possível com um painel de NGS abrangente. Os subtipos mais frequentes de CMT no sul do Brasil são

CMT1A e CMTX1. Nossos resultados trouxeram benefícios diretos aos pacientes e familiares ao propiciar diagnóstico definitivo e adequado aconselhamento genético. O conhecimento da epidemiologia das neuropatias hereditárias no Rio Grande do Sul fomentará o desenvolvimento de futuros projetos nestas condições raras e negligenciadas. Além disso, nossos resultados definirão o protocolo diagnóstico assistencial de CMT no Sistema Único de Saúde no único Serviço de Referência em Doenças Raras (SRDR) do estado, o Serviço de Genética Médica do HCPA, com potencial de ser aplicado para os demais SRDRs e serviços especializados do país.

Palavras chave:

Rendimento diagnóstico, doença de Charcot-Marie-Tooth, Neuropatia Hereditária com Susceptibilidade à Paralisia por Pressão (HNPP), amplificação da sonda multiplex dependente da ligação (MLPA), sequenciamento de nova geração (NGS).

ABSTRACT

Background: Hereditary neuropathies, in particular Charcot-Marie-Tooth disease (CMT), are a group of diseases with great genetic heterogeneity, with more than 60 related genes. Several complementary studies, often unnecessary and expensive, are performed in an attempt of a definitive diagnosis and this implies high personal, family and social costs, even being a rare disease. The diagnostic yield of genetic studies for CMT is little known, with a lack of epidemiological data to build better strategies outside the US and Europe. **Objective:** We aimed to evaluate the diagnostic yield of a sequential molecular diagnostic strategy for cases with demyelinating forms of CMT (CMTde) or Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies (HNPP) suspicion, and of a next-generation sequencing panel (NGS) for cases with axonal forms of CMT (CMTax) suspicion. In addition, we intended to generate initial epidemiological data on the most frequent subtypes of CMT in southern Brazil, as well as to perform clinical and neurophysiological characterization of cases with confirmed diagnosis. **Methods:** A single center cross-sectional study was performed in which we consecutively recruited families with clinical suspicion of CMT or HNPP between September 2010 and August 2019 at the Neuromuscular Genetics Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). **Results:** 94 patients (55 families) with CMT suspicion were evaluated. Overall, the diagnostic yield of the combined strategy of Multiplex-Ligation-dependent-Probe-Amplification (MLPA) of *PMP22/GJB1/MPZ* and *PMP22/GJB1/MPZ* Sanger sequencing was 63.6% (28/44) for index cases with CMTde suspicion (21 CMT1A, 5 CMTX1 and 2 with likely CMT1B diagnosis). Five of the 11 index cases (45.4%) with CMTax suspicion had at least a possible diagnosis with the NGS panel of 104 inherited neuropathies-related genes (one each with CMT1A, CMT2A, CMT2K, CMT2U and CMT2W). Gait assistance was required for 15.4% of patients with CMT, and 5.5% were wheelchair bound. **Conclusion:** Sequential molecular diagnosis strategies with MLPA + target Sanger sequencing for CMTde had high diagnostic yield and almost half of CMTax families had at least a possible diagnosis with the comprehensive NGS panel strategy. Most common subtypes of CMT in southern Brazil are CMT1A and CMTX1. Our results have brought direct benefits to patients and families by providing definitive diagnosis and adequate genetic counseling. Knowledge of the epidemiology of hereditary neuropathies in Rio Grande do Sul will foster the development of future projects in these rare and neglected conditions. In addition, our findings will define the diagnostic protocol for CMT at the state's

only Rare Disease Reference Service (RDRS) of Brazilian National Health System (SUS), Medical Genetics Service of HCPA, with the potential to be applied to other RDRS and specialized services in the country.

Key Words: Diagnostic Yield, Charcot-Marie-Tooth Disease, Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies (HNPP), Multiplex-Ligation-dependent-Probe-Amplification (MLPA), Next-Generation Sequencing (NGS).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de seleção dos estudos para elaboração do projeto.

Figura 2 - Culpable miseria. Desenho nº 22.

Figura 3 – Principais etapas envolvidas numa reação de MLPA

Figura 4 – Sequenciamento de DNA pelo método dideoxi.

Figura 5 - Sequenciamento de Nova Geração Illumina.

Figura 6 – Marco Conceitual

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - STROBE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PNP: Polineuropatia Periférica

CMT: Charcot-Marie-Tooth;

CMTax: formas axonais de Charcot-Marie-Tooth

CMTde: formas desmielinizantes de Charcot-Marie-Tooth

HNPP: Neuropatia Hereditária com Susceptibilidade à Paralisia por Pressão;

NHM: Neuropatias Hereditárias Motoras distais;

NHSM: Neuropatias Hereditárias Sensitivas e Motoras;

NHSA: Neuropatias Hereditárias Sensitivas e Autonômicas;

NCS: Nerve Conduction Studies

CHN: Neuropatia com Hipomielinização Congênita;

CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;

ENMG: Eletroneuromiografia;

DNA: Ácido Desoxirribonucleico;

MLPA: *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*;

PCR: Reação da Cadeia da Polimerase;

NGS: Sequenciamento de Nova Geração;

WGS: Sequenciamento do Genoma Inteiro;

WES: Sequenciamento do Exoma Inteiro;

SUS: Serviço Único de Saúde;

SRDR: Serviço de Referência em Doenças Raras;

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

LGM: Laboratório de Genética Molecular;

SGM: Serviço de Genética Médica;

UAMP: Unidade de Análise Molecular de Proteínas;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	17
2.2 Definindo o problema.....	17
2.3 Aspectos Históricos da Doença de Chacot-Marie-Tooth.....	18
2.4 Aspectos Clínicos e Avaliação Diagnóstica Inicial.....	20
2.5 Aspectos Genéticos.....	21
2.6 Classificação Clínica, Neurofisiologica e Genética.....	22
2.7 Aspectos Epidemiológicos.....	23
2.8 Definição da PNP hereditária de acordo com fenótipo	23
2.9 Diagnóstico molecular específico.....	24
2.10 Fenótipos Específicos e Testes Moleculares Relacionados.....	24
2.10.1 Formas Desmielinizantes.....	24
2.10.1.1 CMT1 e CMT4.....	24
2.10.1.2 CMTX.....	26
2.10.1.3 Neuropatia Hereditária com Suscetibilidade a paralisia por Pressão (HNPP)....	27
2.10.2 Forma Axonal.....	27
2.10.2.1 CMT2.....	28
2.11 Análise Molecular para CMT.....	29
2.11.1 MLPA.....	30
2.11.2 Sequenciamento de Sanger.....	30
2.11.3 Sequenciamento de Nova Geração.....	33
2.12 Tratamento.....	34
2.13 Rendimento das Estratégias para Diagnóstico Molecular em CMT.....	34

2.13.1 Painéis de Genes.....	35
2.13.2 Sequenciamento Completo Exoma/Genoma.....	36
2.13.3 Estudos Realizados no Brasil.....	36
3. MARCO CONCEITUAL	37
4. JUSTIFICATIVA	38
5. OBJETIVOS	39
5.1 Objetivo geral	39
5.2 Objetivos específicos	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
7. ARTIGO	43
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
10. ANEXOS E/OU APÊNDICES	75

1. Introdução

O termo neuropatias hereditárias é utilizado pela maioria dos autores para descrever um grupo heterogêneo de doenças genéticas em que a polineuropatia periférica (PNP) é o único sinal presente ou é o fenótipo predominante (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015). O envolvimento dos nervos periféricos nas PNP hereditárias é mais frequentemente sensitivo e motor (NHSM), como na doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT), foco deste projeto; mais raramente podendo ser apenas motor, como nas neuropatias hereditárias motoras distais (NHM), ou apenas sensitivo e autonômico, como nas neuropatias hereditárias sensitivas e autonômicas (NHSA) (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015).

Na classificação mais utilizada atualmente, as formas de CMT desmielinizantes autossômicas dominantes são classificadas como CMT1, e as autossômicas recessivas como CMT4. As formas axonais tanto autossômicas dominantes quanto recessivas são classificadas como CMT2. As formas com herança ligada ao X são classificadas como CMTX. A forma CMT3 era atribuída à síndrome de Dejerine-Sottas e foi abandonada como veremos durante a revisão da literatura (BIRD, 2019).

As primeiras descrições de CMT foram publicadas em 1886 por Jean-Martin Charcot e Pierre Marie em Paris e por Howard Tooth na Inglaterra (MATHIS et al., 2015; OUVRIER, 2010). No início do século 20 através da neuropatologia foi descrita a forma desmielinizante da doença e posteriormente, com o advento da neurofisiologia clínica, foi possível separar as formas de CMT em axonais e desmielinizantes. Após, os grandes avanços em NHSM surgem com a aplicação clínica da genética molecular. Em 1991 foi identificada a duplicação do gene *PMP22* como a causa de CMT1A, com numerosos outros subtipos de CMT sendo descritos nos anos seguintes, chegando a mais de 60 genes relacionados às PNP hereditárias atualmente (MATHIS et al., 2015).

Apesar de serem condições negligenciadas e relativamente pouco estudadas, as PNP hereditárias encontram-se entre as condições monogênicas mais prevalentes, sendo a prevalência estimada de CMT de 1: 3.300 nascidos vivos. CMT1A, o subtipo mais comum de CMT, pode corresponder a cerca de 20% dos indivíduos que consultam em clínicas especializadas em doenças neuromusculares com PNP crônica não classificada, entretanto a prevalência dos subtipos genéticos específicos varia de acordo com a população. Enquanto CMT1A representa 20% dos casos de CMT no Japão (ABE et al., 2011) e 30% na Grécia e em Barcelona (VAN BROECKHOVEN, 1996), pode chegar a 51% dos casos na Alemanha

(GESS et al., 2013) até >80% dos casos na Finlândia, Suécia, Reino Unido e França (VAN BROECKHOVEN, 1996).

Poucos estudos avaliaram aspectos epidemiológicos de CMT no Brasil. CMT foi a causa de 15,5% (JÚNIOR; BARREIRA, 1987) e 8% (FREITAS; NASCIMENTO; FREITAS, 1995) dos casos de PNP de causa conhecida acompanhada em 2 hospitais universitários brasileiros. Em estudo realizado em Ribeirão Preto, 53 famílias com suspeita de CMT1 foram identificadas entre 1998 e 2000, sendo a duplicação do *PMP22* presente em 42 casos (79%) (JUNIOR et al., 2005). Não há dados epidemiológicos sobre os demais subtipos de CMT no Brasil.

O diagnóstico do subtipo específico de CMT só pode ser confirmado através de análise genética, não sendo possível esta diferenciação apenas com bases clínicas e neurofisiológicas. Este processo pode parecer muito complexo uma vez que há mais de 60 genes relacionados a formas de PNP hereditárias, entretanto na maioria das populações (VAN BROECKHOVEN, 1996) a maior parte dos casos de CMT são causados por variantes patogênicas em 4 genes ou regiões: duplicação ou mutação de ponto no *PMP22*, *GJB1*, *MPZ* e *MFN2*. Sendo que destes, a duplicação do *PMP22* é destacadamente a alteração genética mais frequente, sendo responsável por até 90% dos casos de CMT1 (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015; SAPORTA et al., 2012). Entretanto, como vimos acima, a frequência dos subtipos de CMT varia de acordo com a população, sendo provável haver diferenças regionais significativas no rendimento de diferentes estratégias de diagnóstico molecular para estas condições.

O objetivo da presente dissertação será o de avaliar o rendimento diagnóstico de estratégia sequencial de diagnóstico molecular para casos com suspeita de CMT desmielinizante ou Neuropatia Hereditária com Susceptibilidade à Paralisia por Pressão (HNPP, da sigla da terminologia em inglês) e de painel de genes por sequenciamento de nova geração para casos com suspeita de CMT axonal. Além disso, será possível gerar dados epidemiológicos iniciais sobre os subtipos mais frequentes de CMT no Sul do Brasil, bem como realizar caracterização clínica e neurofisiológica dos casos com diagnóstico confirmado, possibilitando a expansão da descrição das características fenotípicas deste grupo de doenças. Destacamos a aplicabilidade prática do produto da presente dissertação, o qual será definidor do protocolo diagnóstico assistencial de NHSM no SUS no único Serviço de Referência em Doenças Raras (SRDR) do Rio Grande do Sul, o Serviço de Genética Médica do HCPA, com potencial de ser aplicado para os demais SRDRs e serviços especializados do país.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Realizamos revisão sistematizada da literatura de estudos que avaliaram o rendimento de protocolos de diagnóstico molecular de CMT e HNPP, com enfoque principal no método de MLPA (*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*). Para esta busca de estudos foram consultadas as bases de dados PubMed, EMBASE e LILACS utilizando os termos "Charcot-Marie-Tooth" E "MLPA" conforme o acrônimo PECO, sem restrições de data ou idioma. Ver **Figura 1**.

A busca detalhada realizada na base de dados PubMed foi: ("charcot-marie-tooth disease"[MeSH Terms] OR ("charcot-marie-tooth"[All Fields] AND "disease"[All Fields]) OR "charcot-marie-tooth disease"[All Fields] OR ("charcot"[All Fields] AND "marie"[All Fields] AND "tooth"[All Fields] AND "disease"[All Fields]) OR "charcot marie tooth disease"[All Fields]) AND ("multiplex polymerase chain reaction"[MeSH Terms] OR ("multiplex"[All Fields] AND "polymerase"[All Fields] AND "chain"[All Fields] AND "reaction"[All Fields]) OR "multiplex polymerase chain reaction"[All Fields]) OR ("multiplex polymerase chain reaction"[MeSH Terms] OR ("multiplex"[All Fields] AND "polymerase"[All Fields] AND "chain"[All Fields] AND "reaction"[All Fields]) OR "multiplex polymerase chain reaction"[All Fields] OR "mlpa"[All Fields]) AND (next[All Fields] AND ("family characteristics"[MeSH Terms] OR ("family"[All Fields] AND "characteristics"[All Fields]) OR "family characteristics"[All Fields] OR "generation"[All Fields]) AND ("base sequence"[MeSH Terms] OR ("base"[All Fields] AND "sequence"[All Fields]) OR "base sequence"[All Fields] OR "sequence"[All Fields])) AND (("diagnosis"[MeSH Terms] OR "diagnosis"[All Fields] OR "diagnostic"[All Fields]) AND yield[All Fields])

Entretanto, antes de detalharmos os aspectos relacionados as questões de pesquisa encontrados na busca sistematizada à literatura, realizaremos uma breve revisão sobre as PNP hereditárias utilizando múltiplas referências originais e revisões narrativas sobre o tema obtidas tanto através da revisão sistematizada da literatura apresentada acima, quanto por buscas manuais sobre o tema.

2.2. Definindo o problema

As neuropatias hereditárias compreendem um grupo heterogêneo de doenças genéticas em que a presença de polineuropatia periférica pode ser o único sinal clínico ou pode fazer parte

de uma síndrome de envolvimento multissistêmico. A maioria dos autores, entretanto, utiliza o termo neuropatia hereditária apenas para as condições em que a neuropatia periférica é o único sinal presente ou o fenótipo predominante essa será a definição utilizada no presente projeto. (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015).

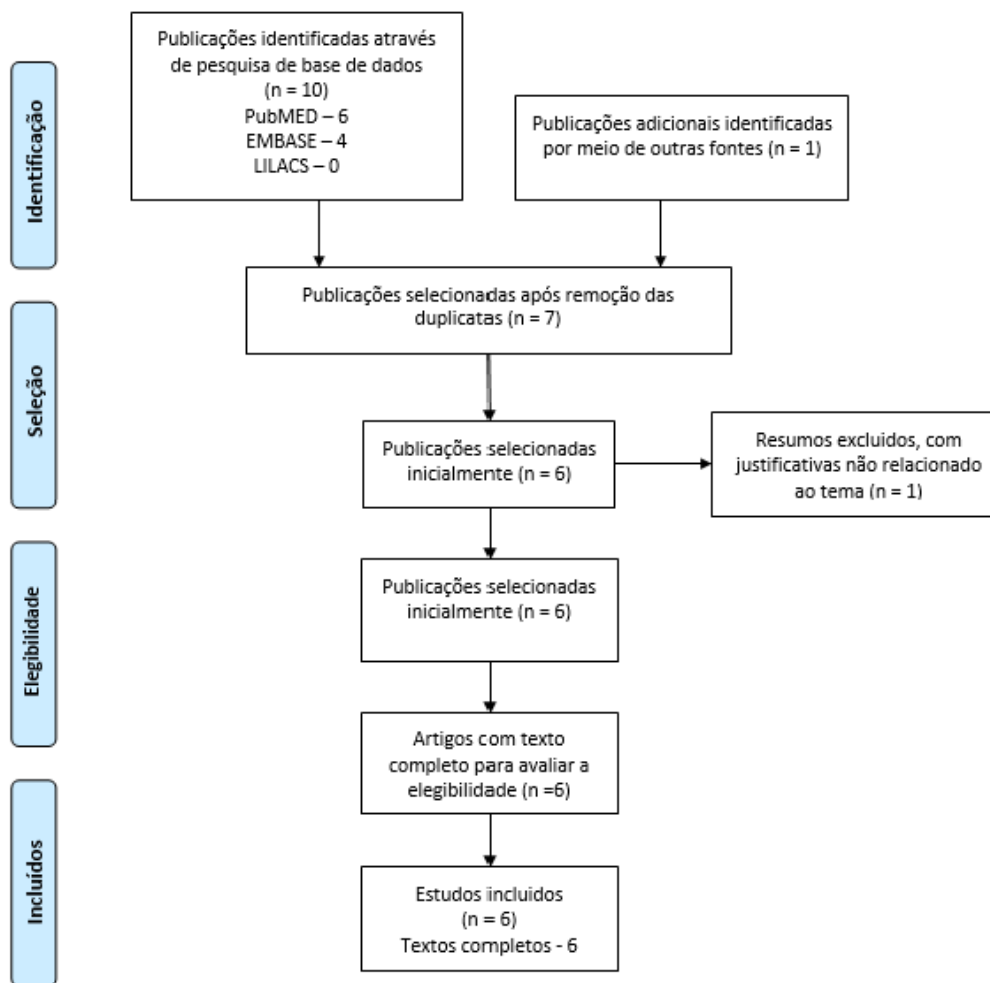


Figura 1 - Fluxograma de seleção dos estudos para elaboração do projeto.

O envolvimento dos nervos periféricos nas PNP hereditárias pode ser sensitivo e motor, como ocorre no grupo de doenças chamadas de neuropatia hereditária de Charcot-Marie-Tooth e na polineuropatia amiloidótica familiar, ou apenas motor como ocorre nas neuropatias hereditárias motoras distais (NHM); e apenas sensitivo e autonômico, como ocorre nas neuropatias hereditárias sensitivas e autonômicas (NHSA). Alguns autores consideram a NHM e NHSA como espectros do CMT. (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015).

2.3. Aspectos Históricos da Doença de Charcot-Marie-Tooth

As primeiras descrições de CMT foram publicadas em 1886 por Jean-Martin Charcot e Pierre Marie em Paris e por Howard Tooth na Inglaterra. Charcot e Marie descreveram 5 casos de pacientes que apresentavam marcada atrofia da musculatura distal: 3 destes casos com início infantil, 1 caso que poderia ser considerado uma apresentação clássica do que hoje consideramos CMT1 ou CMT2 e 1 caso provavelmente relacionado a NHTA. Tooth, no mesmo ano, também descreveu 5 casos com apresentação típica de CMT1 ou CMT2 e, ao contrário de Charcot e Marie que consideravam a topografia provável da lesão como medular, sugeriu que a condição ocorreria por envolvimento dos nervos periféricos (MATHIS et al., 2015; OUVRIER, 2010).

Nos anos seguintes começam a surgir numerosos relatos de variantes do fenótipo CMT. Em 1893, Jules Dejerine e Jules Sottas descreveram a neurite hipertrófica intersticial, uma neuropatia de início precoce na infância, que posteriormente passou a ser denominada de síndrome de Dejerine-Sottas e mais recentemente de CMT tipo 3. Já na era molecular, mutações em genes relacionados à CMT1 e CMT4 foram identificados nos casos com fenótipo Dejerine-Sottas, o qual deixou de ser considerado uma entidade distinta de CMT para ser considerado como uma forma de apresentação mais grave destas outras formas.

Anos após, outra variante de NHTA associada à ataxia e tremor foi descrita por Gustave Roussy e Gabriel Levy, posteriormente designada síndrome de Roussy-Levy; também hoje considerada uma variante de CMT1. O primeiro relato de uma forma de CMT com herança ligada ao X foi realizado por Herrigan em 1889 (MATHIS et al., 2015; OUVRIER, 2010). Curiosamente, há documentação de representações visuais de CMT que antecedem as descrições de Charcot, Marie e Tooth; como um desenho realizado por Goya (Francisco José de Goya y Lucientes) entre 1803-1824 (**Figura 2**) em que é possível observar um indivíduo com pernas muito finas em suas porções distais (amiotrofia), *pes cavus* e dedos em martelo. (PEREZ-TRULLEN et al., 2012).

Os maiores avanços relacionados às NHTA no início do século 20 ocorreram primeiro no campo da neuropatologia, a qual possibilitou a descrição da doença desmielinizante e definiu características patognomônicas destas condições e, posteriormente, pela aplicação de técnicas de neurofisiologia de pesquisa na prática clínica, as quais permitiram a separação entre as formas de CMT axonais das formas desmielinizantes.



Figura 2 - Culpable miseria. Desenho nº 22. Museu do Prado, Madrid, desenhado entre 1803 e 1824. Note a atrofia das pernas e antebraços, os *pes cavus* com dedos em martelo, e acometimento simétrico. Fonte: PEREZ-TRULLEN et al., 2012

Após este período, grandes avanços nas NHSM surgem com a aplicação clínica da genética molecular, iniciando com estudos de ligação em 1982 em uma forma de CMT ligada ao cromossomo 1 e com a identificação de um *locus* no cromossomo 17p como associado a CMT1A em 1989. Em 1991, pesquisadores da Bélgica e dos Estados Unidos identificaram uma duplicação do DNA no cromossomo 17p contendo o gene relacionado a uma proteína da mielina, *PMP22*, como a causa de CMT1A. Em 1993, no Japão, o gene *MPZ* é descrito como causal para a forma de CMT descrita em 1982. (MATHIS et al., 2015; OUVRIER, 2010). Atualmente, o número de genes descritos como relacionados às NHSM e NHM ultrapassa 60, número que foi incrivelmente acelerado ao longo da última década pelo advento das técnicas de sequenciamento de nova geração (MATHIS et al., 2015). Apesar desta grande heterogeneidade genética, a maioria dos tipos de CMT apresenta fenótipo muito semelhante entre si e semelhantes aos fenótipos clássicos descritos no final do século XIX por Charcot, Marie e Tooth.

2.4. Aspectos Clínicos e Avaliação Diagnóstica Inicial

A primeira etapa na definição do diagnóstico de CMT é estabelecer se o paciente apresenta de fato uma PNP. Esta definição pode ser muito clara clinicamente naqueles indivíduos que apresentam fraqueza e perda sensitiva em um padrão comprimento dependente (regiões distais são mais afetadas e sintomas predominam nos membros inferiores). Os achados usualmente iniciam nos pés e após lentamente progridem até o nível dos joelhos, seguido por acometimento das mãos. Mesmo que seja clinicamente evidente a presença de neuropatia periférica, será necessário confirmar esta hipótese diagnóstica através de estudos neurofisiológicos de neurocondução por eletroneuromiografia (ENMG). A ENMG auxiliará na distinção entre CMT e NHM e também na diferenciação das miopatias distais, um grupo raro de condições clinicamente semelhante às NHM (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015).

Após ter sido definida a presença PNP, deve-se tentar estabelecer se a causa é hereditária. Este passo pode ser fácil em famílias grandes em que múltiplos indivíduos são afetados, o que nem sempre será a regra. Nos quadros de CMT, mesmo que isolados, a história revelará uma evolução lenta dos sintomas ao longo de muitos anos, sendo possível datar a idade de início dos sintomas geralmente na primeira ou segunda década de vida. A ENMG pode auxiliar na investigação de formas hereditárias especialmente na diferenciação das formas desmielinizantes e axonais de CMT, visto que nas formas desmielinizantes ocorre uma diminuição da velocidade de condução nervosa, enquanto nas formas axonais o principal achado é uma queda das amplitudes dos potenciais de ação nervosos. O quadro clínico também pode auxiliar na diferenciação entre formas adquiridas e hereditárias de PNP, sendo CMT geralmente de apresentação simétrica e início insidioso; entretanto a assimetria dos achados não exclui CMT; uma vez que é relatada em até 7% dos pacientes com CMT1A (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015). A presença de *pes cavus* e dedos em martelos também são vistas na maioria dos pacientes com CMT; entretanto, tais achados não são específicos e podem estar presentes em formas adquiridas e potencialmente tratáveis de PNP.

2.5. Aspectos Genéticos

A herança relacionada à CMT pode ser autossômica dominante, recessiva ou ligada ao X. Mesmo em casos isolados com PNP desmielinizante, deve ser realizada pesquisa da duplicação do *PMP22*, uma vez que mutações *de novo* neste *locus* são frequentes (BIRD, 2019; ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015).

Em 67-80% dos indivíduos com CMT1A a mutação foi herdada de um progenitor afetado e em cerca de 20-30% a mutação ocorreu *de novo*. Não há dados sobre a frequência de mutações *de novo* para as demais formas de CMT (BIRD, 2019). Quando a mutação não é detectada nas amostras dos pais de um indivíduo afetado, o risco para os seus irmãos de terem herdado o alelo mutante é baixo, mas maior do que o da população em geral devido a possibilidade de mosaicismo germinativo.

A penetrância de CMT1 é praticamente completa, sendo considerada completa quando avaliada por estudos neurofisiológicos. A grande variabilidade na idade de início e na gravidade dos sintomas pode causar uma falsa impressão de penetrância reduzida. A penetrância de CMTX1 é completa nos homens com variantes patogênicas no *GJB1* (BIRD, 2019; ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015). Os dados de penetrância e frequência de mutações *de novo* para dos demais subtipos de CMT são escassos.

2.6. Classificação Clínica, Neurofisiológica e Genética

Na classificação mais utilizada atualmente, as formas de CMT desmielinizantes autossômicas dominantes são classificadas no grupo CMT1 e as autossômicas recessivas no grupo CMT4. As formas axonais tanto autossômicas dominantes quanto recessivas são classificadas como CMT2. As formas com herança ligada ao X são classificadas como CMTX. A forma CMT3 era atribuída à síndrome de Dejerine-Sottas e foi abandonada, como descrito na seção 2.3 (BIRD, 2019).

As diferentes formas de CMT1 são clinicamente indistinguíveis e podem ser designadas corretamente apenas após confirmação do diagnóstico molecular (BIRD, 2016). Recentemente uma nova classificação foi proposta por autores franceses, na qual inicia-se a denominação pelo padrão de herança, seguida pelo fenótipo e neurofisiologia e por último pelo nome do gene causal. CMT1A nesta classificação passa a ser denominado AD-CMTde-*PMP22dup*; CMT1E, causado por mutações de ponto no *PMP22*, como AD-CMTde-*PMP22*; CMT2A2, como AD-CMTax-*MFN2* (MATHIS et al., 2015). Apesar de parecer mais complexa e colocar um nome mais longo para a condição, esta classificação explicita claramente as características principais da neuropatia. No presente projeto ainda manteremos a classificação clássica, citada no primeiro parágrafo desta seção.

2.7. Aspectos epidemiológicos

CMT é a causa mais comum de neuropatia hereditária, com uma prevalência estimada em 1:3.300 nascidos vivos (BIRD, 2019). Aproximadamente 20% dos indivíduos que consultam em clínicas especializadas em doenças neuromusculares com PNP crônica não classificada, tem CMT1A. Entretanto a prevalência dos subtipos genéticos específicos varia de acordo com a população. No Japão, apenas cerca de 20% dos casos de CMT são devidos a CMT1A, havendo um maior número de casos em que não se identifica o diagnóstico específico (ABE et al., 2011); enquanto a frequência de CMT1A entre os casos com fenótipo CMT1 é de 51% na Alemanha (GESS et al., 2013) e em estudo colaborativo europeu (envolvendo 12 diferentes países) foi de 70% (variando de 30% na Grécia e em Barcelona até >80% dos casos na Finlândia, Suécia, Reino Unido e França) (VAN BROECKHOVEN, 1996). CMTX1 representa pelo menos 10-20% dos casos de CMT (BIRD, 2016-2), chegando a 44% em estudo que avaliou famílias com CMT e velocidades de condução motora do nervo mediano/ulnar entre 30-40m/s. (DUBOURG et al., 2001).

Poucos estudos avaliaram aspectos epidemiológicos de CMT no Brasil. Nesses estudos CMT foi a causa de 15,5% (JÚNIOR; BARREIRA, 1987) e 8% (FREITAS; NASCIMENTO; FREITAS, 1995) dos casos de PNP de causa conhecida acompanhada em 2 hospitais universitários do Brasil. Em estudo realizado em Ribeirão Preto, 53 famílias com suspeita de CMT1 foram identificadas entre 1998 e 2000, sendo a duplicação do *PMP22* presente em 42 casos (79%) (JÚNIOR et al., 2005). Nesse estudo, 84% das famílias relatavam ser caucasoides. Em 32/42 (76%) casos a herança era claramente autossômica dominante, em 9/42 (21%) a apresentação foi esporádica e em 1 indivíduo a história familiar era desconhecida (JÚNIOR et al., 2005). Não há dados epidemiológicos sobre as demais formas de CMT no Brasil.

2.8. Definição da PNP hereditária de acordo com o fenótipo

Após o diagnóstico clínico inicial de CMT e doenças relacionadas, o próximo passo é classificar o fenótipo clínico para direcionar a análise molecular específica e confirmatória. Conforme Rossor et al, 3 perguntas são fundamentais nesta classificação:

- 1) Qual o mais provável modo de herança?
- 2) A PNP é axonal ou desmielinizante?

3) A PNP é predominantemente sensitiva (NHSA), motora (NHM) ou mista (CMT)?

Após a definição do modo de herança mais provável, que muitas vezes não é possível de ser estabelecido, o próximo passo será definir se o predomínio da neuropatia é axonal ou desmielinizante pela ENMG. Velocidade de condução motora do nervo mediano/ulnar menor do que 38m/s classifica a PNP como desmielinizante e velocidades maiores do que este limiar, como axonal. Esta forma de classificação é de grande importância ao considerarmos que todos os pacientes com a forma mais frequente de CMT, a CMT1A, apresentam velocidade de condução do nervo mediano/ulnar menor do que 38m/s. Há ainda uma terceira categoria, o chamado CMT intermediário em que as velocidades de condução variam entre 25-45m/s. Após esta etapa é fundamental determinar o grau de envolvimento motor e sensitivo. Comumente os pacientes com CMT apresentam envolvimento sensitivo significativo na NCS, mas sinais e sintomas clínicos sensitivos mínimos no exame físico. Esta diferenciação é fundamental entre as formas de CMT axonais e as NHM e NHSA (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015).

2.9. Diagnóstico Molecular Específico

Após definição ou forte suspeita de PNP hereditária o próximo passo é tentar estabelecer o diagnóstico molecular específico. Este processo pode parecer muito complexo uma vez que há mais de 60 genes relacionados a formas de PNP hereditárias, entretanto na maioria das populações (VAN BROECKHOVEN, 1996) a maior parte dos casos de CMT apresentam mutações em 5 genes ou regiões: duplicação ou mutação de ponto no *PMP22*, *GJB1*, *MPZ* e *MFN2* (60% no Reino Unido). Sendo que destes, a duplicação do *PMP22* é destacadamente a alteração genética mais frequente, sendo responsável por até 90% dos casos de CMT1 (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015; SAPORTA et al., 2012).

2.10. Fenótipos específicos e testes moleculares relacionados

2.10.1 Formas Desmielinizantes

2.10.1.1 CMT1 e CMT4

A CMT1A é a forma mais frequente de CMT. Os sintomas são semelhantes às demais formas, sendo o protótipo do quadro clínico de CMT descritos nas seções acima. O curso da CMT1A é lentamente progressivo e usualmente não leva à diminuição da expectativa de vida. Muitos

dos pacientes permanecem com capacidade autônoma para deambular, mas usualmente necessitam de órteses para auxiliar na marcha. Menos de 5% ficarão dependentes de cadeira de rodas (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015).

A CMT1A é causada por duplicação de aproximadamente 1.5 milhões de pares de bases no cromossomo 17p11.11-p12 contendo o gene da proteína periférica da mielina 22 (*PMP22*). Mutações de ponto no *PMP22* também podem causar CMT, sendo esta forma usualmente designada de CMT1E (BIRD, 2019), apesar de alguns autores a considerarem uma variante de CMT1A (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015), mutações *de novo* no gene *PMP22* ocorrem em cerca de 6,5% dos pacientes com CMT1A (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013). A proteína periférica da mielina 22 é uma glicoproteína hidrofóbica de 22 kDa, que é expressa principalmente nas células de Schwann e desempenha um papel importante na mielinização, e na proliferação e diferenciação destas células (BIRD, 1993; NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013). A superexpressão do gene *PMP22* diminui a proliferação de células de Schwann e pode afetar a degradação intracelular dos componentes da membrana (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013). O início dos sintomas clínicos ocorre na primeira década de vida, geralmente na infância, caracterizada por um fenótipo típico de CMT com lenta progressão dos sintomas. No entanto, a gravidade da doença é variável, mesmo em indivíduos da mesma família. Em muitos casos, há também hipertrofia nervosa (25%) e em outros há perda auditiva (5%). As velocidades de condução na ENMG serão reduzidas (<38m/s) nos estágios iniciais da doença (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013).

A CMT1B é segunda causa mais frequente de CMT1, sendo responsável por cerca de 5-10% dos casos em outras populações. A CMT1B é causada por mutações de ponto na proteína mielina zero (*MPZ* ou *P0*), localizado no cromossomo 1q22-q23 e representa cerca de 5% dos casos de CMT1 (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013) e também apresenta quadro clínico semelhante ao da CMT1A, podendo estar presentes adicionalmente anormalidades pupilares e surdez neurosensorial (BIRD, 2019). A proteína MPZ é uma glicoproteína de 28 kDa localizada nas células de Schwann. Essa proteína é necessária para a estrutura e função normais da mielina e é encontrada em abundância na mielina dos tecidos nervosos periféricos e está completamente ausente da mielina do sistema nervoso central. CMT1B é caracterizado por um início precoce (geralmente na primeira década) e a maioria das mutações no *MPZ* causa um fenótipo clássico de CMT1; no entanto, algumas mutações causam a forma mais grave da síndrome chamada de Dejerine-Sottas (DS-CMT3B) ou a Neuropatia com

Hipomielinização Congênita (CHN) (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013). Pacientes com início precoce desta condição apresentam em geral velocidades de condução reduzidas na ENMG, já pacientes com início tardio podem apresentar velocidades normais ou levemente reduzidas nos estudos neurofisiológicos.

As demais formas de CMT1 são ultrarraras, sendo que descreveremos algumas delas brevemente abaixo. CMT1C é causado por mutações nos lipopolissacarídeos de fator de necrose tumoral induzida por carboneto (*LITAF*), gene localizado no cromossomo 16p13.1-p12.3 que desempenha papel importante na degradação de proteínas (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013); CMT1D é causada por mutações no gene do elemento 2 de resposta ao crescimento precoce (*EGR2*), localizado no cromossomo 10q21.3; CMT1E é causado por mutações de ponto no gene *PMP22*, causando sintomas mais graves do que em pacientes com CMT1A. Mutações de ponto no *PMP22* também podem causar outros fenótipos como HNPP, DSS (CMT3A) ou CHN; CMT1F é causado por mutações no gene do neurofilamento de cadeia leve (*NEFL*) localizado no cromossomo 8q21, as mutações no gene *NEFL* também causam CMT2E e CMT4C2; CMT1G foi recentemente descrito e é causado por mutações no gene da fibulina-5 (*FBLN5*) no cromossomo 14q32 (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013).

CMT4 é uma forma de PNP hereditária desmielinizante com herança autossômica recessiva. CMT4A é causado por mutações no gene *GDAP1*, caracterizado por idade de início precoce, grave envolvimento motor, escoliose progressiva e marcada redução das velocidades de condução na ENMG. Além do CMT4A, há outras formas descritas, tais como o CMT4B1 (relacionado ao gene *MTMR2*), o CMT4B2 (gene *SBF2* ou *MTMR13*), o CMT4C (gene *SH3TC2*), o CMT4D (gene *NDRG1*), o CMT4F (gene *PRX*), o CMT4G ou CMT-Russe (gene *HK1*), o CMT4H (gene *FYVE* e *FGD4*) e por último o CMT4J que é causado por alterações no gene *FIG4* (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013).

2.10.1.2 CMTX

A CMTX, de herança ligada ao X, é a segunda causa mais frequente de CMT e é caracterizada por neuropatia sensitiva-motora moderada a grave nos homens afetados (usualmente de início entre os 5-25 anos) e sintomas leves a quadros assintomáticos nas mulheres portadoras. A CMTX1 é causada por mutações no gene *GJB1* localizado no cromossomo Xq13.1 que

codifica a proteína conexina-32, sendo responsável por cerca de 90% dos casos de CMT com herança ligada ao X.

Surdez neurossensorial e sinais de envolvimento do sistema nervoso central (como sinal de Babinski e ataxia cerebelar leve) também podem estar presentes na CMTX1. Os achados neurofisiológicos podem variar de redução moderada na velocidade de condução motora do nervo mediano/ulnar (entre 23-40m/s) até valores normais de neurocondução.

Os demais casos de CMTX são relacionados a mutações mais raras nos *locus* CMTX2, CMTX3, CMTX4, CMTX5 e CMTX6 (BIRD, 1993, 2019).

2.10.1.3 Neuropatia Hereditária com Suscetibilidade à Paralisia por Pressão (HNPP)

Deleções de 1.5 milhões de pares de bases na mesma região no cromossomo 17p duplicada no CMT1A causam a HNPP. Pacientes com HNPP apresentam episódios recorrentes e graves de paralisia indolor causada por compressão após mínimas lesões (lesão do nervo mediano a nível do túnel do carpo ou do nervo fibular comum levando a pé caído). O início dos sintomas geralmente ocorre na segunda ou terceira décadas de vida. A recuperação da mononeuropatia é frequentemente completa e quando a recuperação não é completa a incapacidade resultante é geralmente leve. Em cerca de 80% dos casos é encontrado deleção no *PMP22* e nos 20% restantes, variantes patogênicas de pequena escala no gene *PMP22* (BIRD, 2014).

O padrão de HNPP usualmente é bem claro nos estudos neurofisiológicos, que mostram uma PNP de fundo caracterizada por redução dos potenciais de ação sensitivos e reduções limítrofes na velocidade de condução de nervos sensitivos e motores e bloqueio de condução em locais de compressão. O manejo da HNPP envolverá evitar situações que possam predispor a compressões nervosas. Tais medidas incluem evitar consumo abusivo de álcool e posicionamento meticuloso durante atos cirúrgicos. A penetrância da HNPP é desconhecida, sendo que muitos indivíduos com mutações patogênicas apresentam poucos ou nenhum sintoma (ROSSOR, EVANS & REILLY, 2015). A prevalência da HNPP é desconhecida sendo estimada em 2-5 casos para cada 100.000 habitantes, mas possivelmente seja maior devido a sub diagnóstico.

Cabe ressaltar que análise molecular para HNPP não está indicada em episódio isolado de mononeuropatia compressiva. A indicação de avaliação molecular seria a presença de mais de 1 episódio de neuropatia compressiva **ou** 1 episódio de neuropatia por compressão

associada a PNP de causa desconhecida **ou** 1 episódio de neuropatia por compressão e história familiar de PNP ou HNPP (BIRD, 2014).

2.10.2 Forma Axonal

2.10.2.1 CMT2

A doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 2 é uma forma de polineuropatia sensitivo motora hereditária axonal, sendo responsável por cerca de 20% dos pacientes classificados como CMT. CMT2 tem quadro clínico semelhante ao CMT1, porém com início usualmente mais tardio, apresentando velocidades de condução na ENMG normais ou ligeiramente reduzidas. A forma de herança mais frequente é autossômica dominante, embora formas autossômicas recessivas tenham sido descritas.

CMT2A é a forma mais comum de CMT2 e é causada por mutações no gene da mitofusina 2 (*MFN2*), localizada no cromossomo 1q36.22. A mitofusina é uma proteína GTPase semelhante a dinamina, que desempenha um papel importante na fusão das mitocôndrias, quando a proteína é modificada como resultado de mutações ocorre uma transferência insuficiente de proteínas entre as mitocôndrias e os axônios dos nervos periféricos (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013). A maioria dos pacientes (80%) apresentam sintomas precoces (<10 anos) com um fenótipo grave e geralmente tornam-se dependentes de cadeira de rodas próximo dos 20 anos de idade. Os 20% restantes apresentam sintomas tardios (10 a 50 anos) e um fenótipo mais leve, além disso atrofia óptica, anomalias da substância branca cerebral e diabetes mellitus já foram descritas. A velocidade de condução dos nervos mediano/ulnar é normal com amplitudes dos potenciais de ação levemente reduzidas ou ausentes (CHOI et al., 2007).

CMT2B é causado por mutações no gene *RAS*; CMT2C é causado por alterações no gene *TRPV4*; CMT2D (gene *GARS*); CMT2E (gene *NEFL*); CMT2F (gene *HSPB1*); CMT2G (mapeia o cromossomo 12q12-13.3, sem gene conhecido); CMT2H e CMT2K (gene *GDAP1*); CMT2I e CMT2J (gene *MPZ*), CMT2L (gene *HSPB8*); CMT2M (gene *DNM2*), CMT2N (gene *AARS*); CMT2O (gene *DYNC1H1*); CMT2P e CMT2Q (gene *LRSAM1* e *DHTKD1*); CMT2U de início tardio (>50 anos), causado por mutações no gene da metionil-tRN sintetase (gene *MARS*) foi recentemente identificado e descrito como um subtipo de fenótipo mais leve (NICOLAOU; CHRISTODOULOU, 2013).

2.11 Análise molecular para CMT

Há alguns anos a análise molecular para CMT e muitas outras condições neurogenéticas era realizada por teste sequencial de genes individuais utilizando técnica que fosse adequada para avaliação da variante patogênica mais frequente. Neste cenário o gene candidato mais promissor era avaliado inicialmente e caso negativo seguia-se para o segundo gene candidato mais promissor e assim por diante. Esta estratégia parece ser tempo e custo efetiva para CMT1A, mas parece não ser resolutive além de ter alto custo para as formas axonais de CMT, em que cerca de 75% dos casos ficavam sem diagnóstico molecular estabelecido (MURPHY et al., 2013; ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015).

Como a causa mais frequente de CMT, a CMT1A, deve-se a duplicações de regiões genômicas do cromossomo 17p, a técnica de MLPA (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification), uma análise semi-quantitativa que tem como base a PCR multiplex e utiliza mais de 40 sondas específicas para as diferentes sequências de DNA de interesse, permite a avaliação do número de cópias relativas destas sequências e é a técnica de escolha para o diagnóstico de CMT1A (SCHOUTEN et al., 2002).

Em recente estudo realizado nos EUA, cerca de 17.000 amostras de pacientes com suspeita de CMT foram analisadas independente de história familiar ou fenótipo específico. Em 18% dos casos o diagnóstico específico foi obtido, sendo 95% relacionados a 4 genes (*PMP22*, *GJB1*, *MPZ*, *MFN2*) (DIVINCENZO et al., 2014). Apesar de alguns especialistas solicitarem análise para duplicação do *PMP22* para pacientes com sinais clínicos de CMT como primeira investigação, como esta causa é responsável por menos de 40% do total dos casos de CMT, ainda é sugerido realizar ENMG primeiro e apenas caso haja padrão desmielinizante proceder com esta análise como passo a seguir. Caso o MLPA não demonstre a duplicação no *PMP22* pode seguir-se com sequenciamento Sanger dos genes *GJB1*, *MPZ* e *PMP22* ou pode ser realizado sequenciamento de nova geração de painel de genes contemplando os principais ou todos os genes descritos como associados a CMT1 e CMT4 ou CMT ou mesmo sequenciamento completo do exoma ou do genoma (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015). Nos casos em que a ENMG mostrar um padrão axonal pode ser realizado o sequenciamento Sanger do *GJB1* e *MFN2* (19 éxons) ou poder ser realizado diretamente sequenciamento de nova geração de painel de genes contemplando os principais ou todos os genes descritos como associados a CMT2 ou CMT ou mesmo sequenciamento completo do exoma ou do genoma (ROSSOR; EVANS; REILLY, 2015).

O diagnóstico molecular preciso irá encerrar a investigação do paciente, não havendo a necessidade de exames complementares adicionais, muitas vezes de alto custo e invasivos. Além disto, irá possibilitar aconselhamento genético apropriado e com isso o aumento de possibilidade de opções reprodutivas adequadas para o casal; além de possibilitar a participação em futuros ensaios clínicos para estas condições.

Abaixo descreveremos um pouco mais detalhadamente as principais técnicas moleculares envolvidas no diagnóstico genético de CMT.

2.11.1 MLPA

Mais de 300 conjuntos de sondas específicas para um grande número de distúrbios genômicos raros e comuns estão disponíveis comercialmente pela empresa MRC Holland (STUPPIA et al., 2012). Cada sonda de MLPA consiste em duas sondas de oligonucleotídeos individuais (sondas de oligonucleotídeos 5' e 3'), em que cada uma possui uma sequência específica ao DNA alvo (sequência de hibridização) e uma sequência primer universal. Da mesma forma, uma ou ambas as sondas de oligonucleotídeos contém uma sequência *stuffer*, a qual é responsável durante a eletroforese pela diferença de tamanho entre as sondas e como consequência pelo tamanho do produto de amplificação (STUPPIA et al., 2012).

Resumidamente, a reação de MLPA pode ser dividida em cinco etapas principais: desnaturação do DNA; hibridização das sondas MLPA; reação de ligação; reação de PCR; separação dos produtos de amplificação por eletroforese capilar e análise dos resultados (**Figura 3**).

2.11.2 Sequenciamento Sanger

Uma das abordagens diagnósticas para pacientes sem alterações detectados por MLPA do *PMP22* será sequenciar as regiões codificantes dos genes de interesse por método de Sanger. Os éxons que compõem o gene de interesse são amplificados pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é um método *in vitro* que permite a síntese enzimática de sequências específicas de DNA usando dois iniciadores oligonucleotídicos que hibridizam com fitas opostas e flanqueiam a região de interesse do DNA a ser analisado. Uma série repetida de ciclos envolvendo desnaturação do DNA, anelamento (hibridização) com o *primer* (iniciador) e extensão destes *primers* hibridizados pela polimerase de DNA, resulta no

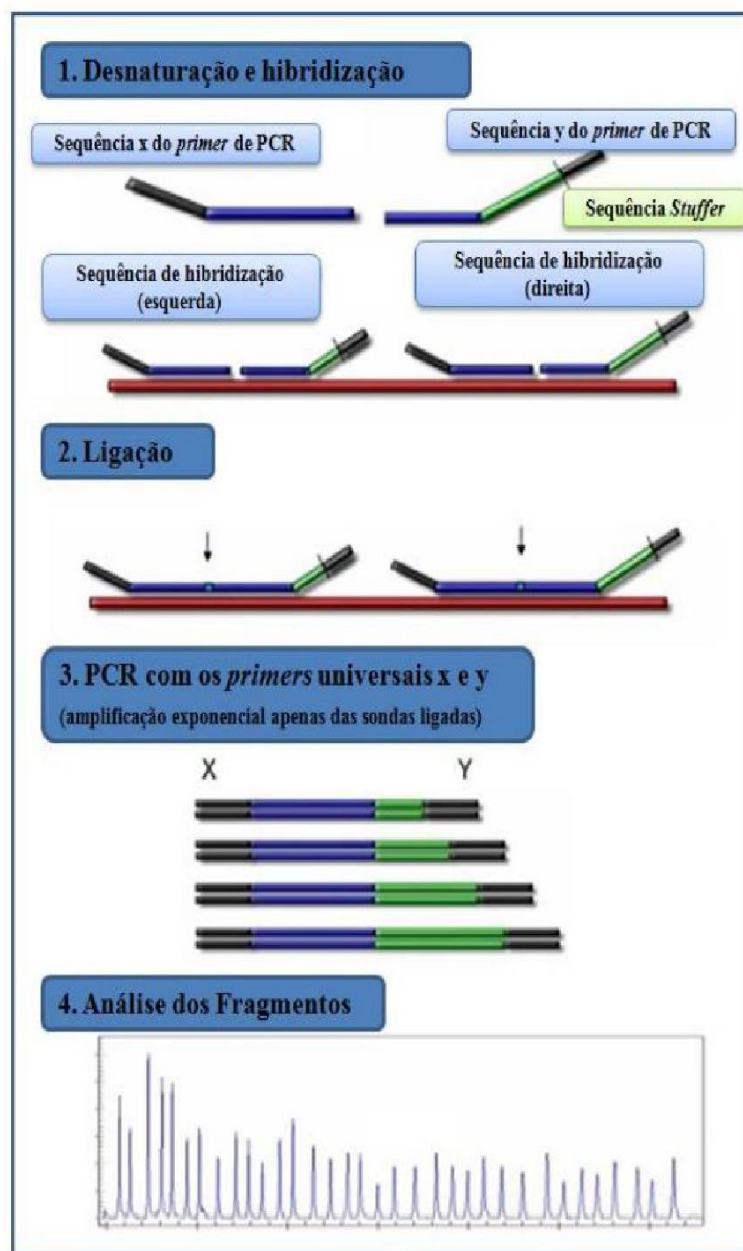


Figura 3 - Principais etapas envolvidas numa reação de MLPA. Durante a primeira etapa, o DNA é desnaturado e incubado com uma mistura de sondas de MLPA. Cada sonda de MLPA consiste em dois oligonucleotídeos individuais, em que cada um possui uma das sequências de primer para a PCR. Estas duas sondas de oligonucleotídeos hibridizam nas sequências alvo adjacentes (1) e, por conseguinte são ligadas durante a reação de ligação (2). Após a ligação ocorre a PCR, no qual apenas as sondas ligadas irão ser amplificadas exponencialmente com um par de primers universal (3). Numa última etapa os produtos de amplificação são separados usando a eletroforese capilar (4) (adaptado de <http://www.mlpa.com>).

acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas extremidades 5' dos *primers* (BERGAMIN et al., 2014). Após a amplificação, todos os éxons do gene alvo são sequenciados por *primers* internos específicos (**Figura 4**).

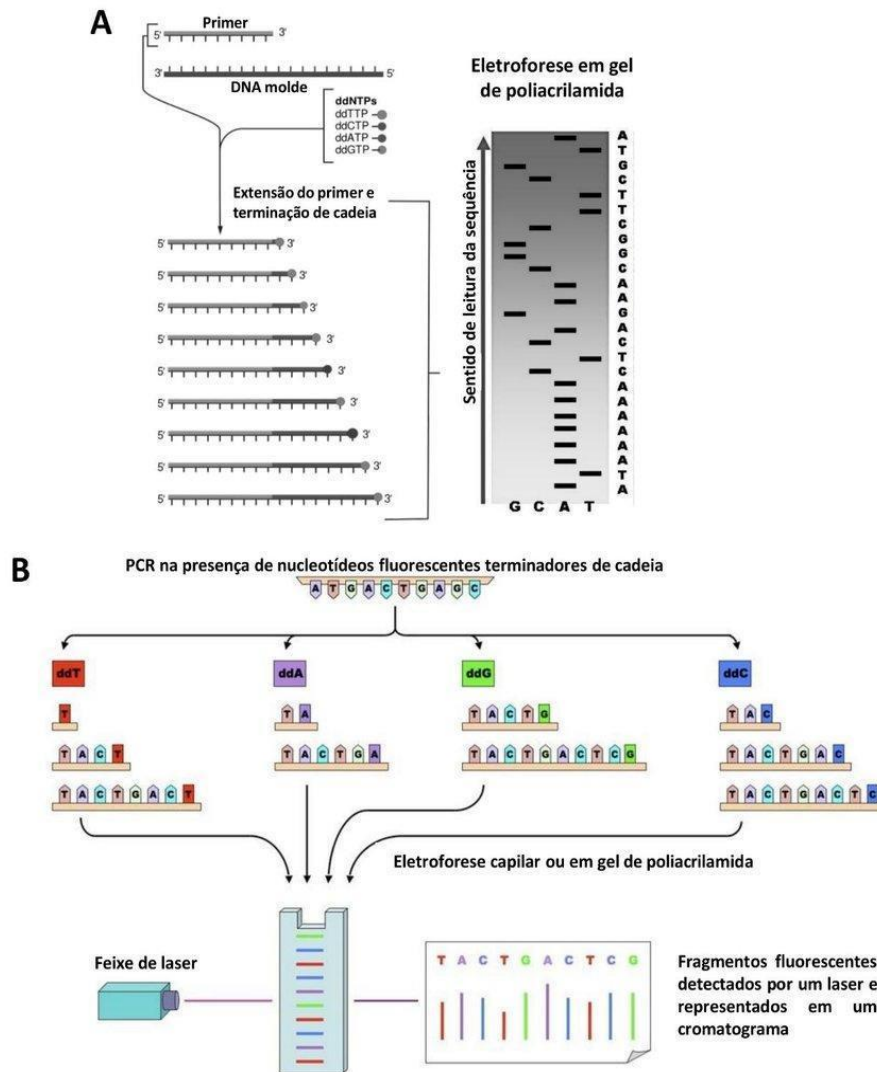


Figura 4 - Sequenciamento de DNA pelo método dideoxi. (A) Método desenvolvido em 1977 por Sanger, onde após a síntese com os terminadores de cadeia as moléculas eram corridas e reveladas em um gel de poliacrilamida. (B) Automatização do método de Sanger, com a utilização de dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência e detectados por um feixe de laser associado a um computador, que gerava a sequência nucleotídica final. (Adaptado de ZANELLA, 2017).

2.11.3 Sequenciamento de Nova Geração

O Sequenciamento de nova geração (NGS) baseia-se numa tecnologia capaz de identificar bases em um pequeno fragmento de DNA usando sinais emitidos, enquanto cada fragmento é ressintetizado de uma fita molde de DNA. O NGS procede de forma massiva, o que permite o sequenciamento rápido de grandes trechos de DNA abrangendo genomas inteiros. O sequenciamento no equipamento Illumina é baseado na incorporação de terminadores reversíveis marcados por cor, que permitem a identificação de bases únicas à medida que são incorporadas às cadeias de DNA (ZANELLA, 2017) (**Figura 5**). Existem outras plataformas de NGS, mas que não serão descritas em detalhe.

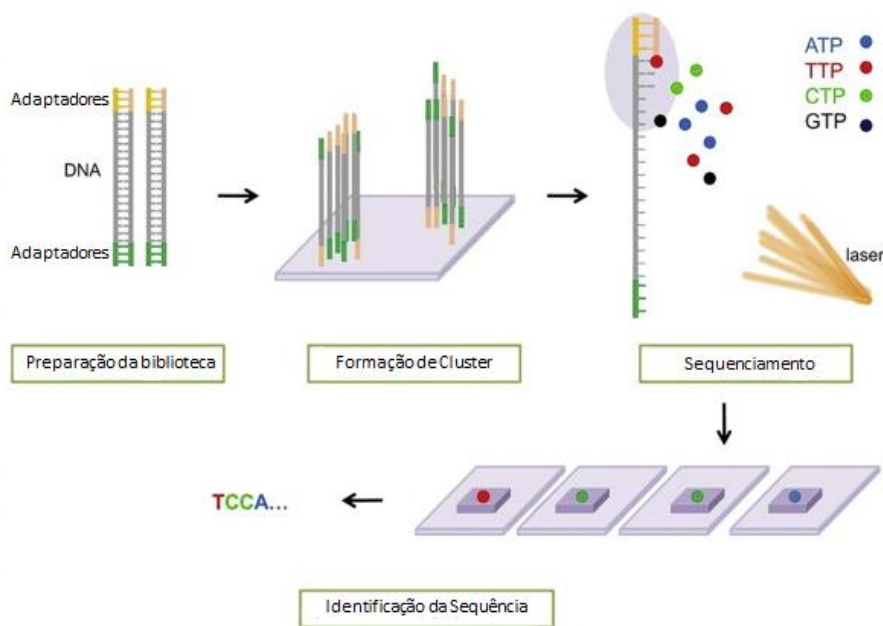


Figura 5 - Sequenciamento de Nova Geração no equipamento Illumina: As moléculas de DNA são primeiramente ligadas aos primers em uma lâmina e amplificadas para que *clusters* locais sejam formados. Os quatro tipos de nucleotídeos terminais (A/T/C/G) são adicionados e cada nucleotídeo é marcado com fluorescência com uma cor diferente e anexado a um grupo terminal (grupo de bloqueio). Os quatro nucleotídeos competem pelos locais de ligação no DNA modelo a ser sequenciado e as moléculas não incorporadas serão lavadas. Após cada síntese, um laser é aplicado para remover o grupo terminal e a sonda. Uma cor fluorescente específica é detectada para cada uma das quatro bases e se torna então visível, permitindo a identificação da sequência (adaptado de ZANELLA, 2017).

2.12 Tratamento

O tratamento de CMT é sintomático e envolve uma equipe multidisciplinar incluindo neurologistas, geneticistas, fisiatras, cirurgiões ortopédicos, fisioterapeutas e terapeuta ocupacional. A fraqueza marcada nas mãos tem implicações ocupacionais relevantes. O uso de calçados especiais, órteses e outros dispositivos para evitar pé caído e auxiliar na marcha geralmente são necessários. Atualmente na base de registros de estudos Clinicaltrials.gov (consulta em 25 de novembro de 2019) há 62 estudos de intervenção que estão em andamento quando colocamos o termo Charcot-Marie-Tooth, contudo apenas 4 destes estudos são relacionados de fato a CMT e apenas dois envolvem ensaios clínicos, um destes com terapia gênica (NCT03520751).

Uma terapia promissora envolve o uso de uma politerapia denominada PXT3003 (envolvendo doses baixas de baclofeno, naltrexona e sorbitol). O PXT3003 retardou a progressão da doença após 3 meses de tratamento em um modelo transgênico de camundongos que superexpressam o gene *PMP22*. Em modelo de células de Schwann, o PXT3003 diminuiu a expressão de *PMP22*, e também melhorou a mielinização em um modelo de co-cultura de gânglios da raiz dorsal de modelo de camundongo de CMT1A. Estes dados sugeriram que o PXT3003 seria uma terapia promissora para CMT1A levando a combinação para fase testes em humanos (CHUMAKOV et al., 2014; PRUKOP et al., 2019). Um estudo fase III, ainda não publicado na íntegra, revelou recentemente eficácia do composto em pacientes adultos com CMT1A (ClinicalTrials.gov: NCT02579759).

2.13 Rendimento das estratégias para diagnóstico molecular de CMT

Em nossa revisão sistematizada da literatura encontramos 5 estudos estrangeiros sobre rendimento diagnóstico e a doença de Charcot-Marie-Tooth, "diagnostic yield"[All Fields] AND "charcot-marie-tooth"[All Fields]. Nas pesquisas em sites brasileiros, foram encontrados somente 1 estudo sobre o tema.

2.13.1 Rendimento do MLPA, sequenciamento de Sanger e de nova geração

NGS, também conhecido como sequenciamento massivamente paralelo ou de alto desempenho, é uma tecnologia que permite o sequenciamento genético simultâneo de grandes quantidades de DNA: o genoma inteiro (sequenciamento do genoma inteiro – WGS),

todo exoma (sequenciamento do exoma inteiro – WES), abrangendo apenas as sequências codificadoras ou apenas genes direcionados (PIPIS et al., 2019).

No estudo de Bacquet, os resultados através do sequenciamento de nova geração resolveram o diagnóstico molecular em 49 de 123 pacientes, ou seja, o rendimento diagnóstico foi de 40%. (BACQUET et al., 2018). Em um estudo alemão que realizou MLPA e sequenciamento Sanger de genes alvo foram relatados resultados de 1206 pacientes, onde foi mostrado uma alta variabilidade na detecção de mutações, variando de 43% a 87% de todos os pacientes com diagnóstico clínico de CMT. O rendimento diagnóstico foi muito maior na CMT desmielinizante do que em CMT axonal; contudo, outros estudos similares obtiveram rendimento menor (43,5% para todos subtipos de CMT, sendo 56% para desmielinizante e 17% axonal), seguido por outro estudo da Alemanha (56% para todos subtipos de CMT, sendo para 65,6% desmielinizante e 33,1% axonal) e uma série britânica (62,6% para todos subtipos de CMT, sendo 80,4% para desmielinizante e 25,2% axonal); as maiores taxas de detecção foram publicadas em uma série americana (87% para todos subtipos de CMT, sendo 98,2% para desmielinizante e 34,4% axonal) e uma coorte espanhola (83,3% para todos subtipos de CMT, sendo 95,6% para desmielinizante e 61,3% axonal); em estudo transversal multicêntrico europeu publicado recentemente que avaliou 1652 pacientes (60,4% para todos subtipos de CMT, sendo 91,2% para desmielinizante e 43% axonal) (RUDNIK-SCHÖNEBORN et al., 2016).

2.13.1. Painéis de Genes

O rendimento de painel de genes relacionado a PNP hereditárias por NGS realizado em casos familiares tiveram rendimento maior do que em casos esporádicos (49% vs 19%). O rendimento obtido por NGS, segundo o autor, é duas vezes maior que o previamente obtido pelo sequenciamento de Sanger, além disso, o impacto da triagem de NGS baseada em painel é particularmente importante para o subtipo CMT1 (BACQUET et al., 2018).

Em um estudo dinamarquês, foi realizada a implementação de painel de sequenciamento de nova geração de 63 genes associados a CMT, e através de uma análise de coorte de 195 amostras de pacientes previamente analisados por Sanger, nesse estudo foi verificado um aumento de 5,6% no rendimento diagnóstico (VAETH et al., 2019). A introdução do NGS direcionado nos diagnósticos de CMT parece melhorar o rendimento diagnóstico, no entanto, ainda há muito a ser entendido sobre a heterogeneidade genética do CMT.

2.13.2 Sequenciamento Completo do Exoma/Genoma

Embora o sequenciamento completo do exoma (WES, da sigla em inglês) tenha provado, em alguns estudos, ser uma ferramenta de pesquisa confiável para descobrir novos genes associados a CMT, o sequenciamento completo do genoma (WGS, da sigla em inglês) mantém a maior promessa para uma abordagem genômica holística (PIPIS et al., 2019). Entre outras virtudes o WGS oferece cobertura quase completa do exoma, com sequências mais confiáveis do que outras técnicas através de regiões genômicas complexas (PIPIS et al., 2019).

À medida que o NGS se torna mais barato e mais acessível, o uso destas tecnologias está avançando para o uso do WGS como primeira linha, no entanto, para aumentar a taxa de diagnóstico e aprofundar nossa compreensão na base genética da CMT, também se requer habilidades e conhecimentos específicos para interpretação das múltiplas variantes observadas (PIPIS et al., 2019).

2.13.3 Estudos realizados no Brasil

Um recente estudo brasileiro realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão da Universidade de São Paulo (USP) realizou WES em 30 pacientes com CMT, sendo 3 casos com CMT1, 12 com CMT2, 8 com CMT-DI, 4 com NHSM e 3 com NHSA. O rendimento para pelo menos diagnóstico provável foi de 43,3% (13/30). Os autores identificaram 6 variantes patogênicas (2 no *AARS*, e 1 nos genes *SH3TC2*, *GDAP1*, *MME*, *IGHMBP2*) e 7 variantes provavelmente patogênicas (nos genes *KIF1A*, *DRP2*, *MME*, *MPZ*, *VRK1*, *SIGMARI*, *FLVCR1*) na amostra avaliada. Entretanto, os dados deste estudo não foram publicados em formato de artigo e estão apenas disponíveis em banco de teses da USP (TOMASELLI, 2018).

3. MARCO CONCEITUAL

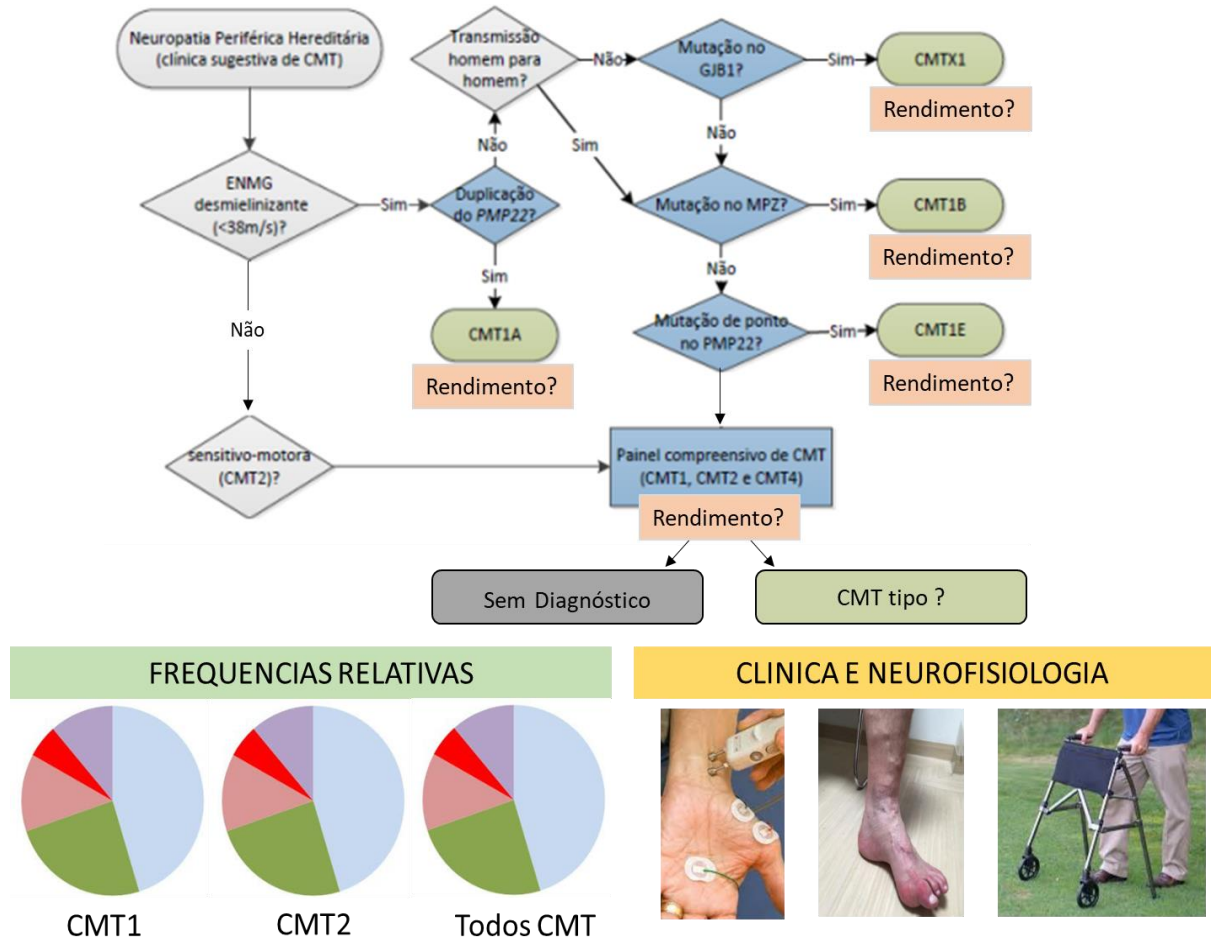


Figura 6 – Marco Conceitual

4. JUSTIFICATIVA

As neuropatias hereditárias são um grupo de doenças raras com grande heterogeneidade genética e, assim como ocorre com outras doenças neurogenéticas, o tempo decorrido desde o início dos sintomas até o correto diagnóstico pode ser muito longo. Diversos exames complementares, muitas vezes desnecessários, são realizados na tentativa de um diagnóstico definitivo e isto implica em um alto custo pessoal, familiar e social.

A investigação diagnóstica e orientação familiar nos casos com herança autossômica dominante não levará a grandes dificuldades para o clínico experiente, contudo mesmo nestes casos a possibilidade de confirmação do diagnóstico molecular exato irá possibilitar valiosas informações para o aconselhamento genético, com mais opções reprodutivas para os casais, além da possibilidade de realização de testes pré-sintomáticos. Para os casos esporádicos a investigação diagnóstica será mais extensa, sendo frequente a detecção de duplicações *de novo* no 17p, novamente com repercussão significativa no aconselhamento genético, já que filhos destes indivíduos terão um risco de 50% de serem afetados pela mesma condição dos pais.

Apesar de geneticamente heterogênea, a maioria dos casos de CMT são devido a duplicações do *PMP22* em heterozigose. As duplicações neste gene podem ser detectadas por kits comerciais de MLPA de forma custo e tempo efetiva, possibilitando a confirmação diagnóstica na maioria destes pacientes. Este mesmo teste pode também detectar deleções nesta mesma região, que confirmam o diagnóstico de HNPP. Mutações de ponto nos genes *MPZ*, *PMP22* e *GJB1* relacionadas à CMT1B, CMT1E e CMTX1, respectivamente (formas de CMT de relevância epidemiológica) podem ser avaliadas facilmente por técnicas convencionais de sequenciamento de Sanger por serem genes considerados pequenos. O diagnóstico molecular das demais formas de CMT1 ou das formas axonais de CMT será em geral mais complexo, frequentemente sendo necessário o uso de técnicas de sequenciamento de nova geração, sendo pouco conhecido o rendimento de todas estas técnicas no contexto da população brasileira.

Pretendemos avaliar o rendimento diagnóstico de estratégia sequencial de diagnóstico molecular para casos com suspeita de CMT desmielinizante ou Neuropatia Hereditária com Susceptibilidade à Paralisia por Pressão (HNPP) e de painel de genes por sequenciamento de nova geração para casos com suspeita de CMT axonal em pacientes provenientes do ambulatório de genética das doenças neuromusculares do Serviço de Genética Médica e de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além disso, pretendemos gerar dados epidemiológicos iniciais sobre os subtipos mais frequentes de CMT no Sul do Brasil, bem como realizar caracterização clínica e neurofisiológica dos casos com diagnóstico confirmado, possibilitando a expansão da descrição das características fenotípicas deste grupo de doenças.

Destacamos algumas das aplicabilidades práticas do produto da presente dissertação. A estratégia de avaliação proposta poderá diagnosticar a maioria dos pacientes acompanhados em nossos ambulatórios e com isso poderá ser definido o padrão de herança nos casos

isolados e poderá ser reforçado o aconselhamento genético para as famílias. A confirmação diagnóstica específica também possibilitará que os familiares em risco possam ser encaminhados ao ambulatório de testes pré-sintomáticos para doenças neurogenéticas do HCPA e que os indivíduos sintomáticos possam ser incluídos em futuros estudos locais ou mesmo internacionais nestas condições. Ou seja, este projeto trará benefícios diretos aos pacientes e familiares (especialmente relacionados ao aconselhamento genético), possibilitará a descrição epidemiológica local para o desenvolvimento de futuros projetos e definição de protocolos diagnósticos assistenciais para a avaliação deste grupo de doenças. Além disso, o presente projeto será definidor do protocolo diagnóstico assistencial de NHSM no SUS no único Serviço de Referência em Doenças Raras (SRDR) do Rio Grande do Sul, o Serviço de Genética Médica do HCPA, com potencial de ser aplicado para os demais SRDRs e serviços especializados do país.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o rendimento diagnóstico de estratégia sequencial para diagnóstico molecular de CMT e HNPP.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o rendimento diagnóstico do MLPA dos genes *GJB1*, *MPZ* e *PMP22* para pacientes com suspeita de CMT1 e HNPP.
- Avaliar o rendimento diagnóstico do sequenciamento de Sanger dos genes *GJB1*, *MPZ* e *PMP22* para pacientes com suspeita de CMT1.
- Avaliar o rendimento diagnóstico de painel de sequenciamento de nova geração de 104 genes relacionados a neuropatias hereditárias para pacientes com suspeita de CMT2.
- Definir o perfil epidemiológico local dos pacientes com CMT e HNPP.
- Realizar caracterização clínica e neurofisiológica dos casos com diagnóstico molecular confirmado

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A. et al. Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. **Journal of Human Genetics**, v. 56, n. 5, p. 364–368, 2011.
- BACQUET, J. et al. Molecular diagnosis of inherited peripheral neuropathies by targeted next-generation sequencing: Molecular spectrum delineation. **BMJ Open**, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2018.
- BERGAMIN, G. et al. Mutation Analysis of MFN2 , GJB1 , MPZ and PMP22 in Italian Patients with Axonal Charcot – Marie – Tooth Disease. p. 540–550, 2014.
- BIRD, T. D. Charcot-Marie-Tooth Neuropathy X Type 1. **GeneReviews®**, p. 1–18, 1993.
- BIRD, T. D. Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2 Summary Genetic counseling Establishing the Diagnosis. **NIH**, p. 1–31, 2016.
- BIRD, T. D. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview 1 . Clinical Characteristics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy. **GeneReviews**, p. 1–22, 2019.
- CHOI, B. et al. Molecules and Rapid Diagnosis of CMT1A Duplications and HNPP Deletions by Multiplex Microsatellite PCR. v. 23, n. 1, p. 39–48, 2007.
- DIVINCENZO, C. et al. The allelic spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease in over 17,000 individuals with neuropathy. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 2, n. 6, p. 522–529, 2014.
- DUBOURG, O. et al. The frequency of 17p11.2 duplication and Connexin 32 mutations in 282 Charcot-Marie-Tooth families in relation to the mode of inheritance and motor nerve conduction velocity. **Neuromuscular Disorders**, v. 11, n. 5, p. 458–463, 2001.
- FREITAS, M. R. G.; NASCIMENTO, O. J. M.; FREITAS, G. R. Polineuropatia: estudo de 407 casos atendidos no Hospital Universitário Antonio Pedro de 1978 a 1989. **Arq Neuropsiquiatria**, v. 53, n. 3- b, p. 545–551, 1995.
- GESS, B. et al. Charcot-Marie-Tooth disease: Frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. **Neuromuscular Disorders**, v. 23, n. 8, p. 647–651, 2013.
- JUNIOR, W. M. et al. 17p duplicated Charcot-Marie-Tooth 1A Characteristics of a new population. p. 972–973, 2005.
- JÚNIOR, W. M.; BARREIRA, A. A. Diagnóstico das neuropatias periféricas: aspectos gerais da população em estudo. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 50, p. 433–440, 1987.
- MATHIS, S. et al. Charcot-Marie-Tooth diseases: An update and some new proposals for the classification. **Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 10, p. 681–690, 2015.
- MURPHY, S. M. et al. and Guidelines for Genetic Testing. v. 83, n. 7, p. 706–710, 2013.
- NICOLAOU, P.; CHRISTODOULOU, K. Advances in the molecular diagnosis of Charcot-

- Marie-Tooth disease. **World Journal of Neurology**, v. 3, n. 3, p. 42, 2013.
- OUVRIER, R. What can we learn from the history of Charcot-Marie-Tooth disease? **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 52, n. 5, p. 405–406, 2010.
- PEREZ-TRULLEN, J. M. et al. GOYA AND A POSSIBLE FIRST VISUAL REPRESENTATION OF CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE. **Muscle and Nerve**, v. 45, n. 5, p. 762–763, 2012.
- PIPIS, M. et al. Next-generation sequencing in Charcot–Marie–Tooth disease: opportunities and challenges. **Nature Reviews Neurology**, 2019.
- ROSSOR, A. M.; EVANS, M. R. B.; REILLY, M. M. A practical approach to the genetic neuropathies. **Practical Neurology**, v. 15, n. 3, p. 187–198, 2015.
- RUDNIK-SCHÖNEBORN, S. et al. Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: Experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients. **Clinical Genetics**, v. 89, n. 1, p. 34–43, 2016.
- SAPORTA, A. S. D. et al. NIH Public Access. v. 69, n. 1, p. 22–33, 2012.
- SCHOUTEN, J. P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 12, p. e57, 2002.
- STUPPIA, L. et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3245–3276, 2012.
- TOMASELLI, P. J. Avaliação das causas genéticas em pacientes com neuropatia hereditária utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) Avaliação das causas genéticas em pacientes com neuropatia hereditária utilizando técnicas de sequenciamento de nova geraç. 2018.
- VAETH, S. et al. Genetic analysis of Charcot-Marie-Tooth disease in Denmark and the implementation of a next generation sequencing platform. **European Journal of Medical Genetics**, v. 62, n. 1, p. 1–8, 2019.
- VAN BROECKHOVEN, E. N. C. Estimation of the mutation frequencies in charcot-marie-tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: A European collaborative study. **European Journal of Human Genetics**, v. 4, n. 1, p. 25–33, 1996.
- ZANELLA, C. M. **Marcadores Moleculares na Era Genômica : Metodologias e Aplicações Andreia Carina Turchetto-Zolet**. [s.l: s.n.].

7. ARTIGO

Title page

Diagnostic yield of targeted sequential and massive panel approaches for inherited neuropathies

Running Title: CMT and HNPP in Southern Brazil

Janice Pacheco Dias Padilha^{1,2}; Carolina Serpa Brasil³; Alice Maria Luderitz Hoefel^{3,4}; Pablo Brea Winckler^{1,5}; Karina Carvalho Donis^{2,3,6}; Ana Carolina Brusius Facchin^{1,3}; Jonas Alex Morales Saute^{1,2,3,4,5,7*}

1 – Post-graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2– Translational Neurogenetics Laboratory, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

3 - Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

4 – Neurogenetics Clinical Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

5 - Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

6 – Post-graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

7 - Department of Internal Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

* Corresponding author:

Jonas Alex Morales Saute

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

Rua Ramiro Barcelos 2350,

Zip Code 90.035-903, Porto Alegre, Brazil

Phone number: +55 051 33598011

Fax: +55 051 33598010

Acknowledgements

The authors are grateful to patients and their families for participation in this study. The study was funded by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos -HCPA (Grant Number: 17-0174). We thank for the support by the public Brazilian agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We also thank PTC Therapeutics for supporting the genetic diagnosis with a commercial next-generation sequencing panel for inherited neuropathies.

Conflict of interest statement:

Padilha JP, Brasil CS, Hoefel AL, Winckler PB, Donis KC, Brusius-Facchin AC and Saute JA have no disclosures related to this study.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Abstract

Diagnostic yield of genetic studies for Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is little known, with a lack of epidemiological data to build better strategies outside the US and Europe. We aimed to evaluate the performance of two molecular diagnostic strategies for patients with CMT, and to characterize epidemiological findings of these conditions in southern Brazil. We performed a single-center cross-sectional study, in which 94 patients (55 families) with CMT suspicion were evaluated. Overall, the diagnostic yield of the combined strategy of Multiplex-Ligation-dependent-Probe-Amplification (MLPA) of *PMP22/GJB1/MPZ* and *GJB1/MPZ/PMP22* Sanger sequencing was 63.6% (28/44) for index cases with demyelinating/intermediate CMT suspicion (21 CMT1A, 5 CMTX1 and 2 with likely CMT1B diagnosis). Five of the 11 index cases (45.4%) with axonal CMT suspicion had at least a possible diagnosis with next generation sequencing (NGS) panel of 104 inherited neuropathies-related genes (one each with CMT1A, CMT2A, CMT2K, CMT2U and CMT2W). Detailed clinical, neurophysiological and molecular data of families is provided. Sequential molecular diagnosis strategies with MLPA plus target Sanger sequencing for demyelinating/intermediate CMT had high diagnostic yield, and almost half of axonal CMT families had at least a possible diagnosis with the comprehensive NGS panel. Most frequent subtypes of CMT in our region are CMT1A and CMTX1.

Keywords

Diagnosis, Charcot-Marie-Tooth disease, Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, Next Generation sequencing.

Introduction

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is a heterogeneous group of genetic sensory and motor peripheral polyneuropathies.^{1,2} In the classical classification, demyelinating forms are classified as CMT type 1 (autosomal dominant, AD) or 4 (autosomal recessive, AR), axonal forms as CMT type 2, intermediate forms as

CMT-DI and X-linked forms as CMTX; and each specific subtype is designated by a letter given in the chronological order of *locus* mapping.²

A recent systematic review reported prevalence rates of CMT in different populations, ranging from 9.7/100,000 in Serbia to 82.3/100,000 in Norway;³ with CMT1, CMT2 and CMTX relative frequencies varying across regions. Molecular diagnosis is necessary for defining CMT subtypes, and most frequent forms are caused by pathogenic variants in *PMP22*, *GJB1*, *MPZ* and *MFN2*, responsible for up to 95% of CMT cases with a final diagnosis in some series.⁴ A case series from Brazil reported that 79% of families with CMT1 suspicion had CMT1A,⁵ with a lack of epidemiologic information on other CMT subtypes in Latin America.

As the most common variant that causes CMT worldwide is *PMP22* duplication, some authors suggest Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of this gene as the first genetic testing irrespective of nerve conduction studies (NCS) pattern,¹ while others suggest such testing only for demyelinating forms.² If negative results on *PMP22* MLPA are obtained, Sanger sequencing or next generation sequencing (NGS) of the four above-mentioned genes or of most genes associated to CMT should be performed.^{1,2} However, due to great relative frequencies variability of CMT subtypes worldwide, the diagnostic yield and efficiency of these strategies may vary in each region.

We aim to evaluate the diagnostic yield of a sequential molecular diagnostic approach for cases with demyelinating or intermediate CMT (CMTde/CMTin) or Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies (HNPP), and of a comprehensive NGS panel of genes related to inherited neuropathies for CMT2 suspicion, and to characterize epidemiological, clinical, neurophysiological and molecular findings of CMT and HNPP families from Rio Grande do Sul, Brazil.

Materials and Methods

Design and subjects

We performed a single center cross-sectional study, in which consecutive families with clinical suspicion of CMT were recruited from September 2010 to August 2019

at the Neuromuscular Genetics outpatients' clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Eligibility was suspicion of CMT or HNPP according to expert clinical and neurophysiological evaluation. Diagnosis of acquired chronic polyneuropathies was the exclusion criteria.

After considered eligible, patients were classified into three diagnostic certainty categories: (a) diagnosed, when one (for AD and X-linked) or two (for AR) pathogenic variants in a CMT-related gene were found; (b) likely diagnosed, when one (for AD and X-linked) or two (for AR) likely pathogenic variants or one likely pathogenic and one pathogenic variant (for AR) in a CMT-related gene were found; (c) possible diagnosis, when a rare variant of unknown significance (VUS) was found in a CMT-related gene with AD or X-linked pattern of inheritance.

The study was approved by the Ethics in Research Committee of our institution (GPPG-HCPA/17-0174), which follows the Declaration of Helsinki. Informed written consent was obtained from all individuals' or their guardians' prior participation.

Clinical and neurophysiological data collection

We collected data regarding sex, age, parental consanguinity, family recurrence, age at onset, age at any walking aid (AWA) and wheelchair (AWC) dependency, and NCS pattern of involvement or preferentially median/ulnar nerves conduction velocities. NCS closer to presentation were preferentially reported and disease duration at the time of NCS was also reported. A detailed neurological examination was performed in all cases and cranial nerves involvement and other neurological or systemic findings than peripheral neuropathy were reported. Such information was collected from patients and relatives and reviewed from medical records. When information regarding walking aid and wheelchair dependency was not provided data was censored.

Molecular analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using salting out method, and kept at -20°C . Copy number variations analysis of *PMP22*, *GJB1* and *MPZ* were performed by MLPA using MRC-Holland SALSA MLPA P-405-A1 kit according to the manufacture's recommendations. Multiplex-PCR products were separated by

capillary gel electrophoresis in an ABI-3500xL Genetic Analyzer equipment (AppliedBiosystems). MLPA analysis was performed by Coffalyser.Net Software (<https://coffalyser.wordpress.com/>). We performed Sanger sequencing of *GJB1*, *MPZ* and *PMP22*. PCR was used to selective exon amplification. Annealing temperatures and primer sequences are available in **Supplemental Table 1** and sequencing details in **Appendix 1**. A commercial comprehensive NGS panel including 104 genes related to inherited neuropathies (**Supplemental Table 2** depict the full list of genes) was performed on HiSeq 6000 Illumina platform (Illumina, San Diego, CA). Alignment and identification of variants using bioinformatics protocols was performed with reference GRCh37 (hg19) version of the human genome.

Variant analysis

Sequences were searched for using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein database, and variants were described with reference to the following transcripts: *GDAP1* (NM_018972.4), *GJB1* (NM_000166.5), *HARS* (NM_002109), *MARS* (NM_004990), *MFN2* (NM_001127660.1), *MPZ* (NM_000530.7), *NEFL* (NM_006158.4), *PMP22* (NM_000304.3). Sequence variations were compared to data available in the Human Gene Mutation Database (HGMD®) and ClinVar. In order to predict the deleterious effect of the identified sequence variations, different bioinformatics tools were applied, PolyPhen-2,⁷ SIFT,⁸ CADD,⁹ M-CAP,¹⁰ Mutation-Taster,¹¹ Human-Splicing-Finder-v3.0¹² and ESEfinder v.3.0¹³ Phylogenetic conservation was estimated with Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP++)¹⁴. Allele frequencies were searched on gnomAD¹⁵ and 1000 genomes browser.¹⁶ Variants were classified according to 2015 American College of Medical Genetics and Genomics criteria.¹⁷

Diagnostic Strategy

We first performed MLPA of *PMP22/GJB1/MPZ* in all index cases with suspected CMT and median/ulnar nerve conduction velocity <38m/s or HNPP suspicion regardless of family history. If MLPA results normal, then *GJB1* sequencing was performed, except if there was clear male-to-male transmission, followed by *MPZ* and *PMP22* sequencing. For patients with suspected CMT and median/ulnar nerve

conduction velocity >38m/s we performed directly the commercial comprehensive NGS panel of inherited neuropathies. See **Figure 1** for details.

Statistical analysis

Quantitative features are reported as mean and median and standard deviation (SD) and interquartile range (IQR).

Results

We included 94 patients [55 families, 44 (80%) with demyelinating/intermediate and 11 (20%) with axonal pattern on NCS] with CMT and 3 patients (3 families) with HNPP suspicion. Consanguinity was reported by 4/43 (9.3%) families with CMTde/CMTin and by none of CMT2 families. Recurrence was reported by 28/43 (65.1%) families with CMTde/CMTin and by 6/11 (54.5%) families with CMT2.

CMTde/CMTin – Mean (SD) age at onset was 18.3 (15) years and disease duration was 20.5 (12.6) years; 9/44 (20.4%) required walking aid and 2/44 (4.4%) were wheelchair bound. Data considering the overall sample (N=76) was similar to index cases (data not shown).

CMT2 – Mean (SD) age at onset was 25.1 (18.6) years and disease duration was 16 (12) years; 3/11 (27.2%) required walking aid and 1/11 (9.1%) were wheelchair bound. Data considering the overall population (N=18) was similar to index cases (data not shown).

Relative frequencies of CMT subtypes and molecular diagnosis performance

Figure 1 and 2 presents the relative frequencies of subtypes diagnosed according to clinical and NCS suspicion for CMTde/CMTin, CMT2 and for the overall sample.

Demyelinating or intermediate CMT

Twenty-two of the forty-four index cases with CMTde/CMTin suspicion were diagnosed by MLPA of PMP22/GJB1/MPZ. Twenty-one patients were heterozygous for *PMP22* duplications (47.7%) and 1 hemizygous *GJB1* deletion (2.3%).

Considering only index cases with demyelinating pattern and without a clear X-linked inheritance, 20/37 (54%) had CMT1A diagnosis. Four index cases were diagnosed with CMTX1, and 2 with likely CMT1B diagnosis by Sanger sequencing. Therefore, *GJB1/MPZ* sequencing confirmed the likely diagnosis of 6/22 (27.2%) families when it was performed after MLPA. Overall, the diagnostic yield of the combined strategy of MLPA (*PMP22/GJB1/MPZ*) + *GJB1/MPZ* Sanger sequencing was 63.6% (28/44) for index cases with CMTde/CMTin suspicion. Four of the sixteen index cases with no alterations on MLPA + Sanger strategy performed NGS diagnostic strategies, one case each with CMT4C and CMT1F were diagnosed and two cases presented normal results on the NGS panel of inherited neuropathies.

Axonal CMT and HNPP

Five of the 11 index cases (45.4%) with CMT2 suspicion had at least a possible diagnosis with the NGS panel of inherited neuropathies (**Figure 1**). We found one family each with diagnosis of CMT1A and CMT2A, and one family each with a possible diagnosis of CMT2K, CMT2U and CMT2W. All three index cases with HNPP suspicion presented heterozygous *PMP22* deletion on MLPA.

Novel variants

We have described 3 variants not previously described in CMT-related genes (**Table 1**). All variants found in the present study were described in **Supplemental Table 3**.

Clinical and neurophysiological characterization

Main clinical and demographical characteristic of patients with most frequent CMT subtypes are shown in **Table 2** and **Supplemental Table 3** presents detailed clinical, genetic and neurophysiological characteristics of all patients in our series.

CMT1A

Forty-eight patients (22 families) with CMT1A were diagnosed; 6/45 (13.3%) required walking aid [5 women, at mean age of 44.1 (17.6) years and at mean disease duration of 11.1 (6) years] and 1 woman (2.2%) was wheelchair bound at

65 year-old, after 22 years of disease duration. Four CMT1A cases (18.2%) were isolated and the remaining eighteen presented similar cases in the family. Median/ulnar nerve conduction velocities were described in 17 cases with a mean (SD) of 18.5 (7.4) m/sec after 15.8 (14.56) years of disease duration. *Pes cavus* was reported in 27/34 (79.4%) and hammer toes in 23/28 (82%) patients in which this information was clearly available. Two patients with CMT1A reported rearing loss, one erectile dysfunction and one have clubfeet.

CMTX1

Eight patients (5 families) with CMTX1 were diagnosed. No patient required walking aid or was wheelchair bound. Median/ulnar nerve conduction velocities were described for 3 cases with a mean (SD) of 22.3 (4.8) m/sec after 17.5 (2.1) years of disease duration. *Pes cavus* was reported in 5/6 (83.3%) and hammer toes in 3/4 (75%) patients in which this information was clearly available. One women presented proximal hyperreflexia.

Discussion

In the present study, we have described clinical, neurophysiological and molecular data of consecutive and well-characterized patients with CMT suspicion from a reference center in rare diseases from Southern Brazil. We have depicted a high diagnostic yield of a sequential molecular diagnosis strategy with MLPA + target Sanger sequencing for CMTde/CMTin and we have shown that almost half of cases with CMT2 had at least a possible diagnosis with a comprehensive NGS panel of inherited neuropathies. Most frequent subtypes of CMT in our region are CMT1A and CMTX1, and we have provided some of the first reports of rare subtypes of CMT in Brazil.

Diagnostic yield

The diagnostic yield of the combined strategy of MLPA of *PMP22/GJB1/MPZ* and *PMP22/GJB1/MPZ* Sanger sequencing was 63.6% for CMTde/CMTin, and the

diagnostic yield of the NGS panel of inherited neuropathies was 45.4% for CMT2 in our study. The performance of our approach was similar to other large studies that combined MLPA and Sanger sequencing strategies for CMTde/CMTin,^{18,19} higher than studies with target sequencing strategies for CMT2¹⁹ and similar to recent studies with NGS panels for CMT2.¹⁹

Interestingly, two CMT1A patients had NCS compatible with CMT2, one performed after 9 and the other after 47 years of disease onset. This information agrees with the suggestion of some authors to perform MLPA analysis of *PMP22* irrespective of NCS results whenever there is clinical CMT suspicion.¹ However, because the panel approach in our study was able to capture the CMT1A index case with initial CMT2 suspicion by copy number variation analysis, our interpretation is that approaches considering NCS optimizes the diagnostic process of CMT. On the other hand, future studies should address the cost-efficiency of NGS panel as a first-line diagnostic strategy for CMT irrespective of NCS compared to the strategy we have performed.

Relative frequency of CMT in Southern Brazil

In our series, 80% of CMT families presented demyelinating/intermediate and 20% axonal forms. Most common CMT subtype was CMT1A, representing 48% of CMTde/CMTin families and 40% of overall CMT families, followed by CMTX1 representing 11% of CMTde/CMTin and 9% of overall CMT families. There was no clearly more frequent CMT2 subtype, and only one family with each diagnosed CMT2 subtype was found. CMT1A relative frequencies in our study were lower compared with a previous study in the state of São Paulo, Brazil that reported that this subtype was responsible for 79% of families with CMT1.⁵ However, relative frequencies of the CMT1A, CMT2 and CMTX subtypes in our study were similar to the frequencies of more recent and larger studies from Germany,¹⁹ and higher than in Denmark.²⁰

Clinical and neurophysiological findings

We intended to build survival curves for handicap in the different CMT subtypes, however only 15.4% of the overall sample required walking aid and 5.5% were wheelchair bound. Therefore, median ages or disease duration for major handicap was not achieved. Six patients (13.3%) with CMT1A required canes/walkers and one patient (2.2%) was wheelchair bound, which are similar proportions to the literature.⁵ No CMTX1 patient in our series required walking assistance, which is similar to the low significant handicap proportion reported in previous larger series.²¹

We have described mean median/ulnar nerve conduction velocities for all CMT cases in which this information was available. Mean nerve conduction velocities for CMT1A and CMTX1 were similar to previous studies.^{5,21,22}

Additional clues for CMT diagnosis

The single family with possible CMT2W presented a complex phenotype with pyramidal findings and peripheral polyneuropathy in the index case. However, two affected relatives presented pyramidal findings with *pes cavus* and hammer toes, and normal NCS, resembling a complicated form of hereditary spastic paraplegia. Our patient with CMT4C presented head drop with prominent proximal weakness and the detailed description of his findings was already published (DE OLIVEIRA et al., 2019).²³

Study limitations

Our study represents a homogenous comprehensive clinical, neurophysiological and molecular data collection on CMT at a single rare disease reference center in southern Brazil. This study strength has the limitation of lower external validity of our results to the overall Brazilian population. Due to retrospective records collection we had significant missing data for some variables, which were detailed described in **Supp Table 3**. Since cases were recruited at a specialized center, relative frequencies of CMT based on population-based studies might be slightly different, especially concerning milder forms. Novel VUS described in CMT2 genes will be

evaluated in more details with segregation and functional studies and NGS panel will be performed for all patients with CMTde/CMTin without diagnosis in future studies with additional research questions.

CONCLUSION

In conclusion, sequential molecular diagnosis strategies with MLPA plus target Sanger sequencing for demyelinating/intermediate CMT had high diagnostic yield and almost half of axonal CMT families had at least a possible diagnosis with a comprehensive NGS panel. Most frequent subtypes of CMT in southern Brazil are CMT1A and CMTX1.

REFERENCES

1. Bird TD. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview. 1998 Sep 28 [updated 2020 Jan 2]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1358/>
2. Rossor AM, Evans MR, Reilly MM. A practical approach to the genetic neuropathies. *Pract Neurol* 2015;15:187-198.
3. Barreto LC, Oliveira FS, Nunes PS, et al. Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology* 2016;46:157-165.
4. DiVincenzo C, Elzinga CD, Medeiros AC, et al. The allelic spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease in over 17,000 individuals with neuropathy. *Mol Genet Genomic Med* 2014;2:522-529.
5. Marques W Jr, Freitas MR, Nascimento OJ, et al. 17p duplicated Charcot-Marie-Tooth 1A: characteristics of a new population. *J Neurol* 2005;252:972-979.
6. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
7. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248-249.
8. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 2001;11:863-874.
9. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 2019; 47:D886-D894.
10. Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, et al. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet* 2016;48:1581-1586.

11. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014;11:361-362.
12. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e67.
13. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3568-3571.
14. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G; NISC Comparative Sequencing Program, Green ED, Batzoglou S, Sidow A. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res* 2005;15:901-913.
15. gnomAD, Genome Aggregation Database, <http://gnomad.broadinstitute.org>, (2018)
16. 1000 Genomes Browser, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>, (2018)
17. Richards S, Aziz N, Bale S, et al., Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, *Genet. Med* 2015;17:405–424.
18. Bacquet J, Stojkovic T, Boyer A, et al. Molecular diagnosis of inherited peripheral neuropathies by targeted next-generation sequencing: molecular spectrum delineation. *BMJ Open* 2018;8:e021632.
19. Rudnik-Schöneborn S, Tölle D, Senderek J, et al. Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients. *Clin Genet.* 2016;89:34-43.
20. Vaeth S, Christensen R, Dunø M, et al. Genetic analysis of Charcot-Marie-Tooth disease in Denmark and the implementation of a next generation sequencing platform. *Eur J Med Genet* 2019;62:1-8.
21. Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, et al. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain* 2003;126:134-151.

22. Carvalho AA, Vital A, Ferrer X, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: clinicopathological correlations in 24 patients. *J Peripher Nerv Syst.* 2005;10:85-92.
23. de Oliveira CM, Fussiger H, Winckler PB, Saute JAM. Dropped head syndrome as a manifestation of Charcot-Marie-Tooth disease type 4C. *Neuromuscul Disord* 2019;29:138-141.

Figure Legends

Figure 1: Flowchart of the sequential diagnostic strategies algorithm

Diagnostic strategy started with the classification of demyelinating or axonal forms of Charcot-Marie-Tooth disease by nerve conduction studies. Copy number variation analysis was performed by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. Light blue boxes indicate molecular testing and other colors, confirmed diagnosis. CMT, Charcot-Marie-Tooth; NCS, nerve conduction studies.^a two cases with demyelinating CMT and negative results on the sequential approach were diagnosed by the NGS panel, one with CTM4C and one with CMT1F, and were not considered in the no diagnosis category of the flowchart.

Figure 2: Relative frequencies of CMT and diagnostic yield

Relative frequency of demyelinating/intermediate and axonal forms of Charcot Marie-Tooth in southern Brazil is presented in percentages. N indicate the number of indexes cases. * Four index cases with demyelinating/intermediate forms of CMT performed a comprehensive next-generation sequencing panel of genes related to inherited neuropathies. CMT, Charcot-Marie-Tooth disease; de, demyelinating; in, intermeditate; NGS, next-generation sequencing.

Table 1: Novel variants in CMT2-related genes

Gene	Nucleotide change	AA change	Mutation type	AF ¹	AF ²	SIFT	PolyPhen2	MT	CADD	MCAP	GERP++ ³	Segregation	Functional Evidence	Fam	N ⁴	ClinVar	ACMG criteria ⁵	Classification
<i>MARS</i>	c.1967G>C	p.Arg656Thr	Missense	0	0	0	1	1	34	0.163	5.75	NA	NA	1	1	No	PM2,PP3	VUS
<i>HARS1</i>	c.305C>T	p.Thr102Ile	Missense	0	0	1	0.038	0.99	21.7	0.029	5.78	NA	NA	1	1	No	PM2	VUS
<i>GDAP1</i>	c.677_679delGAA	p.Arg226del	in-frame deletion	0	0	NA	NA	0.99	NA	NA	4.38 (3.61-4.77)	NA	NA	1	1	No	PM1,PM2,PM4,PP3	Likely Pathogenic

Table 1: Allele frequencies on ¹gnomAD and ²1000 genomes browsers; ³GERP++ data is shown as mean (range) or raw value; ⁴total number of tested individuals; ⁵ American College of Medical Genetics and Genomics criteria, Richards et al, 2015. AA, amino acid; AF, allele frequency; Fam, families; MT, Mutation Taster; NA, not available; VUS, variant of unknown significance.

Table 2: Demographics of the enrolled individuals

	Overall		CMT1A		CMTX1		Unknown		HNPP	
Families/Patients	55/94		22/48		5/8		21/24		3/3	
Female Sex (%)	47 (50%)		29 (60.4%)		3 (37.5%)		7 (29.1%)		2 (66.6%)	
	Mean (SD)	Median (IQR)	Mean (SD)	Median (IQR)	Mean (SD)	Median (IQR)	Mean (SD)	Median (IQR)	Mean (SD)	Median (IQR)
Age	40.7 (18.3)	43 (31)	41.1 (17.7)	43 (28.5)	44.2 (14.9)	42.5 (22)	36.5 (19.2)	37 (27.2)	43.3 (16.2)	49 (31)
Age at onset	21.8 (16.4)	16 (29.25)	22.9 (15.8)	21 (26.7)	20.3 (13)	15 (16.5)	17.4 (15)	14 (18.2)	26.3 (13)	25 (24)
Disease Duration	18.8 (12.8)	15 (19)	18.8 (13.9)	14 (16)	22.4 (6.2)	24 (9.5)	18.2 (13.1)	13.5 (24.7)	17 (12.1)	10 (21)
Walking aid (%)	14/91 (15.4%)		6/45 (13.3%)		0 (0%)		4/24 (16.6%)		0 (0%)	
Wheelchair bound (%)	5/91 (5.5%)		1/45 (2.2%)		0 (0%)		3/24 (12.5%)		0 (0%)	

Table2: Sex is shown as frequencies. CMT, Charcot Marie Tooth disease; HNPP, Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies; IQR, interquartile range; SD, standard deviation.

Supplemental Table 1 Primers used to amplify and sequence the Charcot-Marie-Tooth-related genes.

Gene (Exon)	Primer sequence (5' > 3')		T _{annealing} (°C)	Primer Quantity Forward and reverse (pmol)	Length (bp)
	Forward	Reverse			
<i>GJB1</i> (EX1)	AAGTCAGGGCGTTTGATCTG	CGATATCAGCCATCCCCTAT	50	10	299
<i>GJB1</i> (EX2A)	TGACCATCCTTCCTTTCCTG	ACATGAAGACGGCCTCAAAC	60	10	593
<i>GJB1</i> (EX2B)	GAAAATGCTACGGCTTGAGG	TAGCCAGGGAAGGAAGGTTT	54	10	673
<i>MPZ</i> (EX1)	ATACAATGCCCTTCTGCTC	TCCTGCTCCTGCTTGTTCTT	50	10	395
<i>MPZ</i> (EX2)	TTTCCAAATTGGCCTCTGAC	TGGGGTTATGGCTCAAAAAG	50	10	392
<i>MPZ</i> (EX3)	TACCCTTTCAGCCCAAGAT	GCTCCCAGAGCCTGAATAAA	54	10	499
<i>MPZ</i> (EX4)	GCAGTTTTAGCTGGGAGTCCT	CCCAGATGGGGGATAGTG	45	10	300
<i>MPZ</i> (EX5)	CCATCTGGGCGGAGACTACT	GGCGCACACATCAGTCAC	50	10	296
<i>MPZ</i> (EX6)	CTTGGGGCCTAGACAAGATG	TTTTTGAGGCTGGTTCTGCT	54	10	374
<i>PMP22</i> (EX1)	CACCATGACATATCCCAGCA	CAATTCTGTAAAGCATAGGCACA	50	10	299
<i>PMP22</i> (EX2)	CAAAAGATGTTCCGTTGCAG	GCAGATTGCCAGAACTTCC	50	10	497
<i>PMP22</i> (EX3)	AACGTTGGCTCTTACCATGC	GACTCATGGCTCCCTGTCAC	50	10	388
<i>PMP22</i> (EX4)	CTTCTGCTTCTGCTGCCTGT	CATCCAGTGGGGAGACTCAT	50	10	388
<i>PMP22</i> (EX5)	CTACCCAGCAATTGTCAGCA	CCACCTCCACTGCTTTCTGT	50	10	393

Supplemental Table1: Gene, primer sequence, aneling temperature, primer quantity and length.

Supplemental Table 2 - List of inherited neuropathies related genes included in the next-generation sequencing panel

<i>AAAS</i>	<i>C12orf65</i>	<i>DMN2</i>	<i>GAN</i>	<i>HSPB1</i>	<i>LITAF</i>	<i>MYH14</i>	<i>POLG</i>	<i>SCN11A</i>	<i>SPG11</i>	<i>TTR</i>
<i>AARS1</i>	<i>CCT5</i>	<i>DNMT1</i>	<i>GARS1</i>	<i>HSPB8</i>	<i>LMNA</i>	<i>NAGLU</i>	<i>PRDM12</i>	<i>SCN9A</i>	<i>SPTBN4</i>	<i>VCP</i>
<i>ABHD12</i>	<i>COA7</i>	<i>DST</i>	<i>GBE1</i>	<i>IARS2</i>	<i>LRSAM1</i>	<i>NDRG1</i>	<i>PRPS1</i>	<i>SCO2</i>	<i>SPTLC1</i>	<i>WNK1</i>
<i>AIFM1</i>	<i>COX6A1</i>	<i>DYNC1H1</i>	<i>GDAP1</i>	<i>IGHMBP2</i>	<i>MARS</i>	<i>NEFH</i>	<i>PRX</i>	<i>SCP2</i>	<i>SPTLC2</i>	<i>YARS1</i>
<i>AP1S1</i>	<i>CTDP1</i>	<i>EGR2</i>	<i>GJB1</i>	<i>INF2</i>	<i>MCM3AP</i>	<i>NEFL</i>	<i>RAB7A</i>	<i>SH3TC2</i>	<i>SURF1</i>	
<i>ATL1</i>	<i>DCAF8</i>	<i>ELP1</i>	<i>GNB4</i>	<i>JPH1</i>	<i>MED25</i>	<i>NGF</i>	<i>RETREG1</i>	<i>SIGMAR1</i>	<i>TBCE</i>	
<i>ATL3</i>	<i>DHH</i>	<i>EXOC4</i>	<i>GSN</i>	<i>KARS1</i>	<i>MFN2</i>	<i>OPA1</i>	<i>RNF170</i>	<i>SLC12A6</i>	<i>TDP1</i>	
<i>ATP1A1</i>	<i>DHTKD1</i>	<i>FBLN5</i>	<i>HARS1</i>	<i>KIF1A</i>	<i>MORC2</i>	<i>PDK3</i>	<i>SBF1</i>	<i>SLC25A46</i>	<i>TFG</i>	
<i>ATP7A</i>	<i>DMXL2</i>	<i>FGD4</i>	<i>HINT1</i>	<i>KIF1B</i>	<i>MPZ</i>	<i>PLEKHG5</i>	<i>SBF2</i>	<i>SNAP29</i>	<i>TRIM2</i>	
<i>BSCL2</i>	<i>DNAJB2</i>	<i>FIG4</i>	<i>HK1</i>	<i>KLC2</i>	<i>MTMR2</i>	<i>PMP22</i>	<i>SCN10A</i>	<i>SOX10</i>	<i>TRPV4</i>	

Genes in which at least possibly pathogenic variants have been found are shown in bold

Supplemental Table 3: Index cases and families Stratified.

Fam	Code	Sex	Age	AO	DD	Inheritance	Family Recurrence	Consanguinity	NCS	NCS vel (m/s)	DD NCS	Gene	Nucleotide change (AA change)	Variant Classification	Diagnosis	Walking Aid	AWA	Wheel-chair	AWC	Cranial Nerves and other features	Pes cavus	Hammer toes
1	HMSN1	F	15	2	13	AD	Yes	No	de	8	5	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	NA	No	Yes
1	HMSN2	M	60	45	15	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	rearing loss	Yes	Yes
1	HMSN3	M	74	30	44	AD	Yes	No	de	7	31	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	rearing loss	NA	Yes
2	HMSN4	M	35	10	25	X-linked	Yes	No	Mixed	23.6	16	<i>GJB1</i>	c.44G>A (p.Arg15Gln)	Pathogenic	CMTX1	No	-	No	-	None	Yes	Yes
2	HMSN5	F	57	56	1	X-linked	Yes	No	ax	NA	NA	<i>GJB1</i> *	NA	NA	CMTX1*	No	-	No	-	None	Yes	Yes
3	HMSN6	M	44	14	30	AD	Yes	No	ax	NA	NA	<i>NA</i>	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	NA	NA
5	HMSN7	M	46	17	29	X-linked	Yes	No	de	17	19	<i>GJB1</i>	c.547C>T (p.Arg183Cys)	Pathogenic	CMTX1	No	-	No	-	None	Yes	NA
6	HMSN8	M	39	15	24	X-linked	Yes	No	Mixed	NA	6	<i>GJB1</i>	c.44G>A (p.Arg15Gln)	Pathogenic	CMTX1	No	-	No	-	None	Yes	NA
6	HMSN9	F	57	40	17	X-linked	Yes	No	de	26.3	NA	<i>GJB1</i> *	NA	NA	CMTX1*	No	-	No	-	None	Yes	Yes
7	HMSN10	F	70	20	50	AD	Yes	No	de	21	26	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	Yes
7	HMSN11	M	54	35	19	AD	Yes	No	de	NA	4	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	No	Yes
7	HMSN12	M	19	NA	NA	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	NA	-	NA	-	None	NA	NA
7	HMSN13	F	52	NA	NA	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	NA	-	NA	-	None	NA	NA
8	HMSN14	F	50	13	37	Isolated	No	No	de	15	29	<i>NA</i>	NA	NA	NA	No	-	No	-	rearing loss	NA	NA
9	HMSN15	M	43	35	8	AD	No	No	de	NA	2	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	NA	CMT1A*	No	-	No	-	erectile dysfunction	NA	NA
10	HMSN16	M	50	36	14	AD	Yes	No	ax	38	4	<i>MARS</i>	c.1967G>C (p.Arg656Thr)	VUS (PM2, PP3)	CMT2U possible	Yes	42	No	-	None	Yes	Yes
10	HMSN17	F	24	10	14	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>MARS</i> *	NA	NA	CMT2U possible*	No	-	No	-	None	Yes	NA
12	HMSN18	M	24	5	19	Isolated	No	No	de	20	9	<i>NA</i>	NA	NA	NA	No	-	No	-	intermittent strabismus	NA	NA
13	HMSN19	F	54	35	19	AD	No	No	ax	NA	9	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	Yes
14	HMSN20	M	33	21	12	Isolated	No	No	de	NA	2	<i>NA</i>	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	Yes	Yes
15	HMSN21	F	26	9	17	AD	Yes	No	de	20	8	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	Yes
15	HMSN22	F	59	12	47	AD	Yes	No	de	20	NA	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	Yes	Yes
15	HMSN23	F	33	25	8	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	Club feet	No	No
16	HMSN24	F	63	45	18	AD	Yes	No	de	28	12	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	Yes	55	No	-	None	Yes	NA
17	HMSN25	M	56	43	13	AD	Yes	No	ax	NA	4	<i>HARS1</i>	c.305C>T (p.Thr102Ile)	VUS (PM2, PP3)	CMT2W possible	No	-	No	-	diffuse hyperreflexia, Babinski sign, lower limb spasticity, urinary urge/incontinence	Yes	Yes
17	HMSN26	F	20	2	18	AD	Yes	No	Normal	Normal	14	<i>HARS1</i> *	NA	NA	CMT2W possible*	No	-	No	-	diffuse hyperreflexia, Babinski sign, lower limb spasticity, mild distal touch and vibratory distal sensory loss	Yes	Yes

17	HMSN27	M	80	49	31	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>HARS1</i> *	NA	NA	CMT2W possible*	No	-	No	-	Hypo/arreflexia, Babinski sign, normal tonus, urinary urge/incontinence, sexual dysfunction, HTLV infection	Yes	Yes	
17	HMSN28	F	51	46	5	AD	Yes	No	Normal	Normal	5	<i>HARS1</i> *	NA	NA	CMT2W possible*	No	-	No	-	diffuse hyperreflexia, lower limb spasticity	NA	NA	
18	HMSN29	M	43	15	28	AD	Yes	No	de	NA	24	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
19	HMSN30	M	19	7	12	Isolated	No	No	ax	35	9	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	Hypo/arreflexia, Babinski sign	Yes	Yes
20	HMSN31	F	66	44	22	AD	Yes	No	de	NA	13	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	Yes	56	Yes	65	None	Yes	NA	
20	HMSN32	F	51	42	9	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	No	No	
21	HMSN33	M	26	14	12	Isolated	NA	NA	de	23	4	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	No	NA
22	HMSN34	M	14	2	13	AD	No	No	de	NA	12	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	NA	NA	
23	HMSN35	M	19	13	6	Isolated	No	No	de	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	Yes	Yes
24	HMSN36	M	51	12	39	AD	Yes	No	de	18	33	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	Yes	29	No	-	None	Yes	NA	
24	HMSN37	M	8	2	6	AD	Yes	No	de	11,5	3	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	NA	NA	
24	HMSN38	F	16	3	13	AD	Yes	No	de	NA	5	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	NA	
24	HMSN39	F	NA	37	NA	AD	Yes	No	de	NA	NA	<i>PMP22</i>	NA	NA	CMT1A*	NA	-	NA	-	None	NA	NA	
24	HMSN40	F	45	42	3	AD	Yes	No	de	NA	3	<i>PMP22</i>	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	NA	NA	
25	HMSN41	F	61	47	14	AD	Yes	No	ax	NA	7	<i>GDAP1</i>	c.677_699delGAA	Likely pathogenic (PM1,PM2,PM4,PP3)	CMT2K likely	Yes	50	No	-	wheelchair for long distances at age 61, clubfeet	Yes	Yes	
25	HMSN42	F	33	6	27	AD	Yes	No	ax	NA	22	<i>GDAP1</i> *	NA	NA	CMT2K likely*	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
25	HMSN43	M	39	NA	NA	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>GDAP1</i> *	NA	NA	CMT2K likely*	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
26	HMSN44	F	56	49	7	AD	Yes	No	de	33	1	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	Yes	49	No	-	wheelchair for long distances at age 56	Yes	Yes	
27	HMSN45	M	53	20	33	AD	Yes	No	de	NA	29	NA	NA	NA	NA	NA	Yes	48	No	-	None	Yes	Yes
28	HMSN46	M	44	17	27	Isolated	No	No	ax	40	23	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	Yes	Yes
29	HMSN47	F	70	45	25	Isolated	No	No	de	NA	1	<i>MPZ</i>	c.410G>C (p.Gly137Ala)	Likely pathogenic (PM1,PM2,PM5,PP2,PP3 - CM113755)	CMT1B likely	Yes	69	No	-	None	Yes	Yes	
30	HMSN48	M	22	2	20	AD	Yes	No	de	10	13	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	NA	
30	HMSN49	F	45	35	10	AD	Yes	No	de	20	5	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	Yes	NA	
30	HMSN50	M	9	1	8	AD	Yes	No	de	13	4	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	NA	NA	
33	HMSN51	M	71	30	41	Isolated	No	No	Mixed	35.6	31	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None rearing loss, hyposmia, xeroderma, seizures	NA	Yes
34	HMSN52	F	17	1	16	AD	No	No	NA	Absent	2	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	Yes	16	No	-	None	No	No	
35	HMSN53	M	68	38	30	X-linked	Yes	No	NA	NA	NA	<i>GJB1</i>	c.658C>T (p.Arg220*)	Pathogenic	CMTX1	No	-	No	-	None	NA	NA	
36	HMSN54	M	23	2	21	AR	No	Yes	de	22	7	<i>NEFL</i>	c.293A>G (p.Asn98Ser)	Pathogenic	CMT1F	No	-	No	-	3rd nerve	Yes	NA	

37	HMSN55	F	61	47	14	AD	Yes	No	Mixed	NA	23	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	Yes	60	No	-	None	Yes	Yes	
37	HMSN56	F	56	43	13	AD	Yes	No	de	26	42	<i>PMP22*</i>	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
37	HMSN57	M	45	8	37	AD	Yes	No	de	NA	32	<i>PMP22*</i>	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	NA	Yes	
37	HMSN58	F	43	38	5	AD	Yes	No	de	NA	NA	<i>PMP22*</i>	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	NA	NA	
38	HMSN59	F	58	46	12	AD	Yes	No	de	NA	5	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	No	No	
38	HMSN60	F	36	32	4	AD	Yes	No	de	28	4	<i>PMP22*</i>	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	NA	NA	
38	HMSN61	F	20	13	7	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>PMP22*</i>	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	No	Yes	
38	HMSN62	F	34	14	20	AD	Yes	No	de	NA	13	<i>PMP22*</i>	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	Yes	NA	
38	HMSN63		31	26	5	AD	Yes	No	de	NA	2	<i>PMP22*</i>	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
41	HMSN64	M	19	5	14	AD	Yes	No	de	NA	1	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
41	HMSN65	M	51	NA	NA	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>PMP22*</i>	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	NA	NA	
42	HMSN66	F	32	6	26	AD	Yes	No	de	15	22	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
44	HMSN67	M	11	3	8	AR	No	Yes	de	10	7	<i>SH3TC2</i>	c.1969G>A(p.Glu657Lys)x2	Pathogenic	CMT4C	Yes	5	Yes	9	Bilateral ptosis, right internuclear ophthalmoparesis, VII, dysphagia, tongue weakness and fasciculation (XII cranial nerve), and diminished strength in sternocleidomastoid and trapezius muscles (XI cranial nerve). Head drop, predominant proximal weakness, urinary incontinence.	Yes	Yes	
45	HMSN68	M	36	30	6	AD, AR or X-linked	Yes	No	de	15	3	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
46	HMSN69	M	22	15	7	AD, AR or X-linked	Yes	No	de	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	proximal hyperreflexia	Yes	NA
46	HMSN70	M	22	15	7	AD, AR or X-linked	Yes	No	de	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	proximal hyperreflexia	Yes	NA
48	HMSN71	F	44	5	39	Isolated	No	No	ax	NA	31	<i>MFN2</i>	c.281G>A (p.Arg94Gln)	Pathogenic	CMT2A	Yes	36	Yes	40	None	Yes	NA	
49	HMSN72	F	27	2	25	AR	No	Yes	de	15	22	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	Yes	NA
50	HMSN73	F	53	7	46	AD, X-linked	No	No	de	12	45	<i>MPZ</i>	c.194C>A(p.Thr65Asn) Del GJB1 em	Pathogenic	CMT1B likely	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
51	HMSN74	M	25	11	14	AD, X-linked	Yes	No	Mixed	NA	11	<i>GJB1</i>	hemizigose	Pathogenic	CMTX1	No	-	No	-	None	Yes	Yes	

51	HMSN75	F	29	11	18	X-linked X-linked	Yes	No	NA	NA	NA	<i>GJB1</i> *	NA	NA	CMTX1*	No	-	No	-	None	No	No	
51	HMSN76	F	55	NA	NA	X-linked	Yes	No	NA	NA	NA	<i>GJB1</i> *	NA	NA	CMTX1*	No	-	No	-	None	NA	NA	
52	HMSN77	M	7	1	6	AD	No	No	de	25	3	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
56	HMSN78	F	35	29	6	AD	Yes	No	de	NA	3	<i>PMP22</i>	entire gene deletion	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	No	
56	HMSN79	M	31	22	9	AD	Yes	No	de	NA	1	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
57	HMSN80	M	49	14	35	AD/X-linked	Yes	No	de	NA	30	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
58	HMSN81	M	20	10	10	AD	Yes	No	de	NA	7	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
59	HMSN82	F	59	15	44	AD	Yes	No	de	22	42	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
59	HMSN83	M	29	NA	NA	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	NA	NA	
61	HMSN84	M	46	30	16	AD	Yes	No	de	NA	13	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	Yes	NA	
61	HMSN85	F	70	35	35	AD	Yes	No	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Yes	60	Yes	60	None	NA	NA	
62	HMSN86	F	57	55	2	Isolated AD/X-Linked	No	No	ax	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	NA	NA
63	HMSN87	M	8	2	6	Linked AD/X-Linked	Yes	No	ax	NA	4	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	NA	NA
63	HMSN88	F	28	3	6	Linked	Yes	No	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Yes	21	Yes	21	None	NA	NA	
64	HMSN89	F	60	20	40	AD	Yes	No	de	NA	27	<i>PMP22</i>	entire gene duplication	Pathogenic	CMT1A	No	-	No	-	None	Yes	NA	
64	HMSN90	F	56	17	39	AD	Yes	No	de	NA	26	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
64	HMSN91	M	54	7	47	AD	Yes	No	ax	NA	47	<i>PMP22</i> *	NA	NA	CMT1A*	No	-	No	-	None	Yes	Yes	
65	HMSN92	M	7	1	6	AR AD/X-Linked	No	Yes	de	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	No	No
67	HMSN93	F	41	37	4	Linked	Yes	No	de	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	None	NA	NA
68	HMSN94	M	65	50	15	AD	Yes	No	ax	NA	9	NA	NA	NA	NA	NA	No	-	No	-	Mild sensory ataxia	Yes	Yes
11	HNPP1	M	25	15	10	AD	Yes	No	Mixed	NA	5	<i>PMP22</i>	entire gene deletion	Pathogenic	HNPP	No	-	No	-	None	No	No	
43	HNPP2	F	56	25	31	AD	Yes	No	NA	NA	NA	<i>PMP22</i>	entire gene deletion	Pathogenic	HNPP	No	-	No	-	None	No	No	
54	HNPP3	F	49	39	10	AD	Yes	No	de	NA	1	<i>PMP22</i>	entire gene deletion	Pathogenic	HNPP	No	-	No	-	None	No	No	

Supplemental Table 3 – Clinical, genetic and neurophysiological description of patients

AA, amino acid; AD, autosomal dominant; AO, age at onset; AR, autosomal recessive; AWA, age at walking aid dependency; AWC, age at wheelchair dependency DD, disease duration; F, female; Fam, family; M, male; NA, not available; NCS, nerve conduction studies; *diagnosed based on clinical findings and family molecular diagnosis.

Figure 1: Flowchart of the sequential diagnostic strategies algorithm

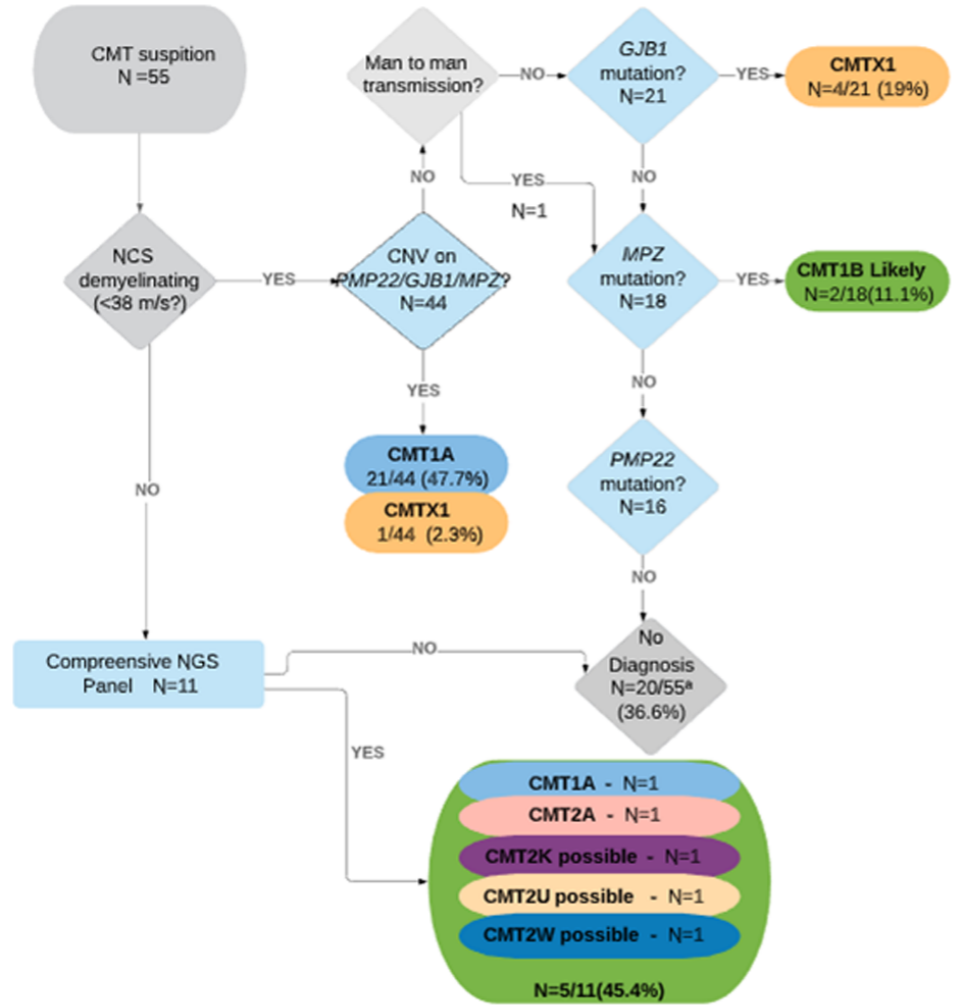
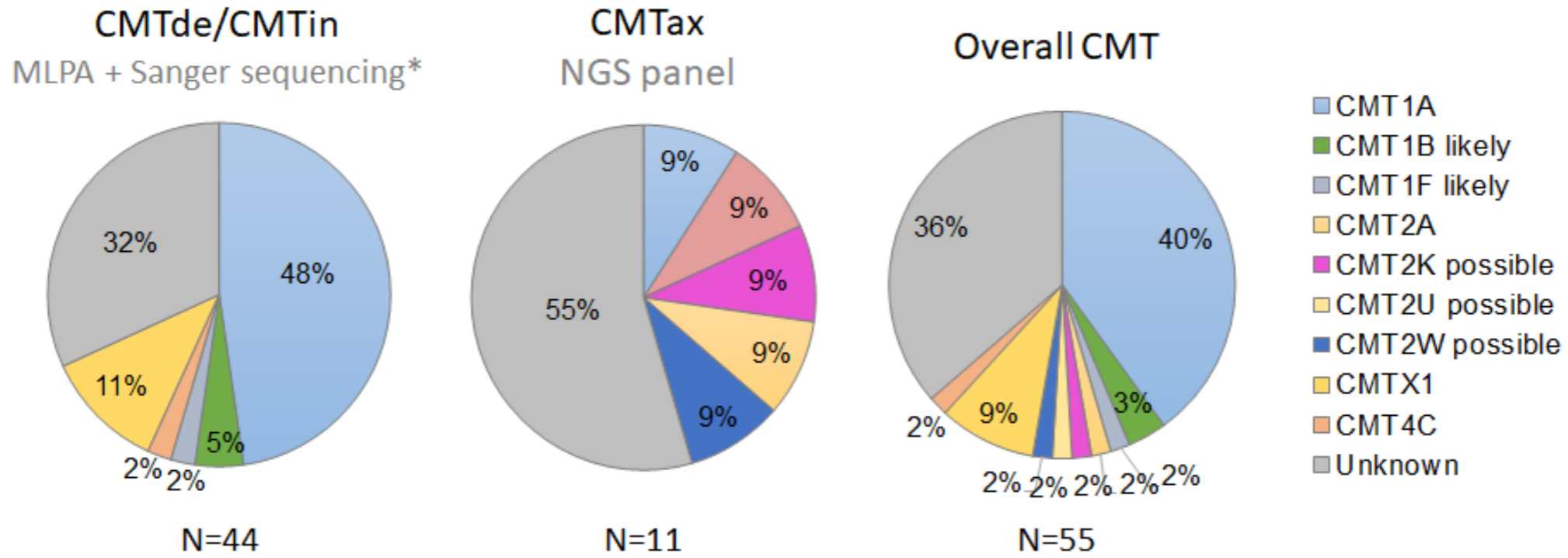


Figure 2: Relative frequencies of CMT and diagnostic yield



Appendix 1

Methods

Sample collection and DNA isolation

DNA were previously extracted from 5mL of the whole blood, collected in EDTA anticoagulant tubes by peripheral venipuncture. Genomic DNA (gDNA) was isolated from peripheral blood leukocytes using Salt Precipitation Method and kept at – 20°C (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). Automatized extraction also was performed, using iPrep Purification Instrument (Invitrogen Life Science Technologies) or iPrep Purelink gDNA Blood Kit, as specifications and protocols by manufacturer. Once extracted, DNA samples were kept at -20°C. DNA purity and quantity was evaluated by NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

A set of commercially available probes for Charcot-Marie-Tooth disease (MRC-Holland P405-A1), which includes *PMP22* (17p.11.2), *MPZ* and *GJB1* genes, as well as probes flanking the CMT/HNPP on chromosome 17p12.

For *PMP22* analysis, three flanking genes probes were analyzed, one probe for each of the 5 exons, plus a second probe for exons 1, 3 and 4. In addition, the assay contains reference probes located outside the CMT/HNPP region. *GJB1* analysis included 5 probes; a probe for exons 1 and 2; and 3 probes for exon 3. *MPZ* analysis included probes for the 6 exons of the gene and 10 reference probes. Multiplex-PCR products were separated by capillary gel electrophoresis in an ABI-3500xL Genetic Analyzer equipment (AppliedBiosystems). MLPA analysis was performed by Coffalyser.Net Software (<https://coffalyser.wordpress.com/>). All preparation and execution of MLPA protocol was performed at the Molecular Genetics Laboratory of Medical Genetics Service, HCPA and MLPA fragments product at the Metabolite and Protein Analysis Unit, HCPA, Experimental Research Center.

Next-generation sequencing (NGS)

Patients with clinical suspicion of CMT2 (axonal CMT), were further sequenced on a gene panel targeting 104 genes related to inherited peripheral polyneuropathies. Target regions capture was performed by probes using Illumina technology. Libraries were built on custom kit with minimum 95% horizontal coverage of target bases with 10 or more reads (usually between 96 and 98% with ≥ 10 reads, depending on DNA quality), according to the guidelines of Brazilian Society of Medical Genetics and Genomics and 100x vertical coverage on average. Alignment and identification of variants was performed by bioinformatics protocols with reference to GRCh37 version of the human genome. Illumina HiSeq 6000 NGS sequencing was performed using hybridization technique. Variants were annotated using the in-house software Abracadabra (by João Paulo Kitajima, São Paulo, Brazil).

Amplification of genes

Polymerase chain reaction (PCR) was used to selectively amplify *GJB1* (exon 1, 2A and 2B) and *MPZ* (exons 1, 2, 3, 4, 5 and 6). Specific annealing temperatures and primer sequences are given in **Supplemental Table 1**. PCR was performed in 25 μ L containing 50 ng of genomic DNA, 200 μ M of each dNTP, specific amount of each primer (see **Supplemental Table 1**), 50 mM of MgCl₂ and 5U of *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen™). Cycling conditions were initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, spent 30 sec to the annealing of each primer in a specific temperature (see **Supplemental Table 1**) and elongation at 72°C for 1 min, with final extension at 72°C for 10 min. Each PCR product was verified by electrophoresis on a 1.5 % (w/v) agarose gel, with visualization under UV light.

Direct DNA sequencing

The same primers used to generate PCR amplicons were used to the following sequencing reaction. Amplicons were purified using 2.5 U of Exonuclease I and 0.25 U of Shrimp Alkaline Phosphatase. Direct DNA sequencing was performed in 2.5 μ L and this mixture was used in the PCR reaction in 1.6 pmol of forward and/or reverse primers and with a BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied

Biosystems) following the manufacturer's instructions, and analyzed in the ABI-3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Results were analyzed by Sequencing Analysis Software v5.1, and SeqScape v3.1 (Applied Biosystems). Sequence variations were compared to data available in the Human Gene Mutation Database (HGMD®) database.

<p>Title and abstract (Item 1) (a) Indicate the study’s design with Title and abstract 1 a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found</p>	<p>Pg43-44 Pg 43-44</p>
<p>Introduction Background/rationale (Item 2): Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported Objectives (Item 3): State specific objectives, including any prespecified hypotheses</p>	<p>Pg 45-46 Pg - 46</p>
<p>Methods Study design (Item 4): Present key elements of study design early in the paper Setting (Item 5): Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection</p>	<p>Pg 46-47 Pg46-47</p>
<p>Participants Item 6: (a) Cohort study—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up Case-control study—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls Cross-sectional study—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants Participants 6 (b) Cohort study—For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed Case-control study—For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case</p>	<p>Pg 46-47 NA</p>
<p>Variables Item 7: Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable Data sources/</p>	<p>Pg 47-49</p>
<p>Data sources/measurement 8* For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group Bias 9 Describe any efforts to address potential sources of bias Study size 10 Explain how the study size was arrived at Quantitative variables 11 Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why (a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) Cohort study—If applicable, explain how loss to follow-up was addressed Case-control study—If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed Cross-sectional study—If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy</p>	<p>Pg 49-51 Pg 47-49 Pg 46-47 Pg 46-47 Pg 46-47 and53 NA Pg 46-47</p>
<p>Statistical methods 12 (e) Describe any sensitivity analyses Results</p>	<p>NA</p>

(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	Pg 46-47
(b) Give reasons for non-participation at each stage	Pg 46-49
Participants 13*	
(c) Consider use of a flow diagram	Pg 46-49
(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	NA
(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	NA
Descriptive data 14*	
14*	Pg 49 and SUPPL TABLE3
(c) Cohort study—Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	
Cohort study—Report numbers of outcome events or summary measures over time	
Case-control study—Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure	
Outcome data 15*	
Cross-sectional study—Report numbers of outcome events or summary measures	
(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	NA
(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	NA
Main results 16	
(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	Table 2 and suppl table 3
Other analyses 17 Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	
	Table 1
Discussion	
Key results 18 Summarise key results with reference to study objectives	Pg 51-53
Limitations 19 Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision.	Pg 53
Discuss both direction and magnitude of any potential bias	
Interpretation 20 Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity	Pg 51-53
of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	
Generalisability 21 Discuss the generalisability (external validity) of the study results	Pg 51-53
Other information	
Funding 22 Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	Pg 44

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação possuiu como objetivo principal avaliar o rendimento diagnóstico de estratégia sequencial para diagnóstico molecular de CMT e HNPP. Consideramos que este objetivo foi atingido. As estratégias sequenciais de diagnóstico molecular com MLPA e sequenciamento Sanger direcionado para CMT de apresentaram alto rendimento diagnóstico, e quase metade das famílias com CMTax tiveram pelo menos um diagnóstico possível com um painel de NGS abrangente.

Com relação a definição do perfil epidemiológico local dos pacientes com CMT e HNPP mostramos que os subtipos mais frequentes de CMT no sul do Brasil são CMT1A e CMTX1. As frequências relativas de CMT1A em nosso estudo foram menores do que em um estudo anterior no estado de São Paulo, que relatou que esse subtipo era responsável por 79% das famílias com CMT1 (JÚNIOR et al., 2005), até então o único dado epidemiológico no Brasil sobre esta condição. Além disso, realizamos alguns dos primeiros relatos de subtipos ultrarraros de CMT no Brasil.

Com relação a caracterização clínica e neurofisiológica dos casos com diagnóstico molecular confirmado de CMT, consideramos que o objetivo foi atingido. Nossa intenção era construir curvas de sobrevida para incapacidade significativa na deambulação (necessidade de muletas/andador e cadeira de rodas) nos subtipos mais frequentes de CMT, no entanto, como apenas 15,4% da amostra geral necessitaram de ajuda para caminhar e 5,5% estavam em cadeiras de rodas, a mediana de idade ou duração de doença para incapacidade não foi atingida. Contudo, as proporções de incapacidade encontradas em nosso estudo foram semelhantes às da literatura, confirmando a progressão marcadamente lenta deste grupo de condições.

Nossos resultados trouxeram benefícios diretos aos pacientes e familiares ao propiciar diagnóstico definitivo e adequado aconselhamento genético. O conhecimento da epidemiologia das neuropatias hereditárias no Rio Grande do Sul fomentará o desenvolvimento de futuros projetos nestas condições raras e negligenciadas. Além disso, nossos resultados definirão o protocolo diagnóstico assistencial de CMT no Sistema Único de Saúde no único Serviço de Referência em Doenças Raras (SRDR) do estado, o Serviço de Genética Médica do HCPA, com potencial de ser aplicado para os demais SRDRs e serviços especializados do país.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

As variantes de significado incerto descritas nos genes relacionados a CMT2 serão avaliadas com mais detalhes por estudos de segregação e se necessário com análises funcionais a fim de definir a patogenicidade dessas variantes. Além disso, realizaremos o painel de NGS para neuropatias hereditárias para todos os pacientes com CMT de/CMT in sem diagnóstico, com objetivo de relatarmos o rendimento diagnóstico desta estratégia em estudos futuros.

O diagnóstico molecular das famílias com CMT proporcionados por este estudo já levou ao início de novos projetos nesta condição por nosso grupo de pesquisa. Recentemente enviamos proposta para edital internacional que pretende descrever a biomecânica da marcha de pacientes com CMT1A pelo sistema *Vicon Motion Capture System* e avaliar a eficácia de três tipos de órteses para pés caídos nos padrões da marcha.

10. ANEXOS E/OU APÊNDICES

Anexo I:

Nº do projeto GPPG ou CAAE _____

Título do Projeto: Diagnóstico molecular das neuropatias hereditárias: Charcot-Marie-Tooth e neuropatia hereditária com suscetibilidade à paralisia por pressão.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa por ter diagnóstico clínico de doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) ou de neuropatia hereditária com suscetibilidade à paralisia por pressão (HNPP). O objetivo dessa pesquisa é estabelecer técnicas para identificar a alteração genética específica dessas doenças. Esta pesquisa está sendo realizada pelo serviço de Genética Médica e de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, você fará duas consultas para aconselhamento genético nos ambulatórios nos quais você já é atendido e será realizada uma análise do seu material genético (DNA). As consultas de aconselhamento genético ocorrerão antes e depois da análise genética.

O aconselhamento genético consiste em explicar as características da doença e dos resultados dos testes genéticos, assim como o impacto e riscos desses resultados não só para a pessoa que está fazendo o aconselhamento, mas também para a família. Para a análise do material genético será utilizada a amostra que você já coletou em outras atividades da sua rotina no HCPA e que está armazenada no Serviço de Genética. Nessa análise serão avaliadas diferentes regiões do DNA (genes) que estão associadas a esses dois grupos de doenças por diferentes metodologias para identificar a alteração genética causadora da doença. Após o término das análises, será agendada outra consulta de aconselhamento genético para a entrega do resultado das avaliações genéticas, momento no qual serão explicados os resultados e as implicações para o seu diagnóstico e repercussões para sua família. O tempo previsto para cada consulta é em torno de 50 minutos e o tempo estimado entre a primeira e última consulta é de 3 meses.

Os riscos e desconfortos associados à pesquisa são o tempo de consulta e de espera pelo resultado, além de que é possível que existam resultados inconclusivos em que não se saibam quais as repercussões dos resultados para o seu diagnóstico ou manejo clínico. Todos estes aspectos serão esclarecidos em detalhes durante as 2 consultas de aconselhamento genético.

Os possíveis benefícios associados à pesquisa são a identificação da alteração genética e estabelecimento do diagnóstico específico de CMT ou HNPP, além da orientação sobre os riscos de seus familiares, como filho(a)s ou irmãos de terem a mesma condição, no chamado aconselhamento genético.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Ao final da pesquisa, se você autorizar, suas amostras poderão ser armazenadas por até 10 anos para ser utilizado em pesquisas futuras. No futuro, qualquer pesquisa que contemple o uso das suas amostras armazenadas deverá ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e você receberá um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorizar esses testes antecipadamente. É importante ressaltar que você poderá participar desta pesquisa mesmo que não autorize a armazenar o material que restou. Se você decidir mais tarde que não deseja ter este material armazenado para uso futuro, você poderá entrar em contato a qualquer momento com a equipe da pesquisa para que suas amostras sejam destruídas, sem ter que explicar as suas razões para fazê-lo.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Ana Carolina Brusius Facchin, pelos telefones (51) 3359-7211 ou (51) 3359-8011, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____